

WO 03/64650

= DE 10203352

<p><b>2003-732841/70</b> B01 D16 E15 (B04 D21) <b>BADI 2002.01.29</b>  <b>BASF AG</b> *DE 10203352-A1  2002.01.29 2002-1003352(+2002DE-1003352) (2003.07.31) C12N  15/62, 1/19, 15/81, C12P 33/00, C12N 15/52  <b>Preparation of 7-dehydrocholesterol, useful as an intermediate for Vitamin D3, and its intermediates or products, comprises growth of organisms with increased activity of specific enzymes</b>  <b>C2003-202034</b>  Addnl. Data: LANG C, VEEN M</p>	<p>B(1-D2, 4-E2E, 4-E8, 4-F9E) D(5-A2, 5-C, 5-H12A, 5-H12E, 5-H14A2, 8-B, 8-B9A1) E(1) 4    (NC2) that contains a sequence for 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (D), lanosterol-C14-demethylase (E), squalene epoxidase (F), squalene synthase (G) or sterol-acetyltransferase (H); and  (3) Organisms genetically modified to have increased activity, relative to the wild-type, of at least one of (A)-(C).</p>
<p><b>NOVELTY</b>  Preparation of 7-dehydrocholesterol (I), and/or its biosynthetic intermediates and/or secondary products, comprises culturing organisms that have, relative to the wild type, increased activity of at least one of <math>\Delta 8</math>-<math>\Delta 7</math>-isomerase (A), <math>\Delta 5</math>-desaturase (B) and/or <math>\Delta 24</math>-reductase (C).</p> <p><b>DETAILED DESCRIPTION</b>  INDEPENDENT CLAIMS are also included for:  (1) Nucleic acid construct (NC1) containing at least one sequence encoding (A)-(C), functionally linked to one or more regulatory signals that ensure transcription and translation;  (2) Combination of at least one NC1 with at least one similar construct</p>	<p><b>USE</b>  7-dehydrocholesterol (I) is an intermediate for Vitamin D3, and its intermediates/secondary products (e.g. zymosterol, lanosterol, squalene, farnesol, geraniol, cholesta-trienol or -tetraenol), useful for synthesis of terpenes; in dermatology and cosmetics; in synthesis of saponins and steroid hormones, and as emulsifiers in skin creams.</p> <p><b>ADVANTAGE</b>  Increasing activity of the specified genes improves product yields.</p> <p><b>EXAMPLE</b>  The <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain GRFtH1E1E11erg5erg6  DE 10203352-A+</p>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

differs from the wild type by containing:

- (1) *ura3*;
  - (2) a truncated sequence for 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, replacing *leu2*; and
  - (3) genes for squalene epoxidase and lanosterol C14-demethylase, replacing genes for C24-methyltransferase and  $\Delta$ 22-desaturase.
- It was transformed with vector pFlat4-D24R, which contains the murine gene for  $\Delta$ 24-reductase, under control of the ADH1 promoter and tryptophan terminator, and transformants cultured for 5 days at 28 °C.

The steroids formed were extracted and analyzed by gas chromatography to indicate a large increase in the amount of 7-dehydrocholesterol (I) formed, also smaller increases in amounts of cholesta-8-enol and cholesta-5,7,24-trienol. Even greater increases in the amount of (I) formed were achieved when the yeast was additionally transformed to over-express  $\Delta$ 8- $\Delta$ 7-isomerase and  $\Delta$ 5-desaturase.

#### TECHNOLOGY FOCUS

Biotechnology - Preferred Method: The organism has increased activity of at least 2, especially all 3, of (A)-(C), particularly as a result of increased gene expression or by introducing nucleic acid encoding

these enzymes. Activity is increased by at least 5, (best 600) %. The organism also has reduced activity of at least one of C24-methyltransferase and  $\Delta$ 22-desaturase, most especially it lacks functional genes for both of these (particularly as the result of knockout recombination), and/or increased activity of at least one of (D)-(H), particularly of (D) and (E), increased in the same way as for (A)-(C), or, for (D), by introducing a sequence, especially one encoding the catalytic region of (D), that is subjected to reduced regulation, relative to the wild-type gene.

Preferred Materials: The nucleic acids introduced to increase expression of (A)-(C) are sequences that encode, respectively, proteins of 230 (murine), 230 (human) or 222 (*Saccharomyces cerevisiae*) amino acid (aa) proteins, or their derivatives formed by substitution, insertion or deletion of aa, provided they have at least 30% identity at the aa level and retain enzymatic activity. Especially the nucleic acids are sequences of 693, 693 or 669 nucleotides (nt). Sequences for increasing activity of (D)-(F) encode proteins of 299 (human), 299 (murine) and 365 (*S. cerevisiae*) aa, respectively, or their derivatives as above, especially sequences of 900, 900 and 1098 nt.

All the protein and nucleic acid sequences are reproduced. The host organism is yeast, and the sequences introduced may be codon-

DE 10203352-A+1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



2003-732841/70

optimized. NC1 optionally includes at least one sequence encoding (D)-(H). (A) converts zymosterol to cholesta-7,24-dienol (X); (B) converts (X) to cholesta-5,7,24-trienol (Y), and (C) converts (Y) to (I), zymosterol to lathosterol and (X) to cholesta-7-enol.

Preparation: The transgenic yeast are prepared by standard transformation with NC1/NC2, especially as part of a vector or plasmid.

(120pp1251DwgNo.0/7)

DE 10203352-A/2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. August 2003 (07.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/064650 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/52,  
15/81, 9/90, 9/02, C12P 33/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/00592

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. Januar 2003 (22.01.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 03 352.8 29. Januar 2002 (29.01.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];  
67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LANG, Christine [DE/DE]; Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin (DE).  
VEEN, Markus [DE/DE]; Becherweg 30, 13407 Berlin (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF 7-DEHYDROCHOLESTEROL AND/OR THE BIOSYNTHETIC INTERMEDIATE OR SUBSEQUENT PRODUCTS THEREOF IN TRANSGENIC ORGANISMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON 7-DEHYDROCHOLESTEROL UND/ODER DESSEN BIOSYNTHETISCHEN ZWISCHEN- UND/ODER FOLGEPRODUKTEN IN TRANSGENEN ORGANISMEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of 7-dehydrocholesterol and/or the biosynthetic intermediate or subsequent products thereof by the cultivation of organisms, in particular, yeasts which show an increased activity of at least one activity, selected from delta-8/delta-7 isomerisation activity, delta-5 desaturase activity or delta-24 reductase activity. The invention further relates to the nucleic acid constructs necessary for production of the genetically-modified organisms and the genetically-modified organisms, in particular, the yeasts themselves.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Organismen, insbesondere Hefen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus delta8-delta7-Isomere Aktivität, delta5-desaturase-Aktivität oder delta24-reduktase-Aktivität aufweisen. Ferner betrifft die Erfindung die zur Herstellung der genetisch veränderten Organismen benötigten Nukleinsäurekonstrukte, sowie die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Hefen selbst.



WO 03/064650 A1

Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten in transgenen Organismen

5

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Organismen, insbesondere Hefen. Ferner betrifft die Erfindung die zur Herstellung der genetisch veränderten Organismen benötigten Nukleinsäurekonstrukte, sowie die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Hefen selbst.

15

7-Dehydrocholesterol, auch als Cholesta-5,7-dienol oder Provitamin D<sub>3</sub> bezeichnet, dessen biosynthetische Zwischenprodukte des Sterolstoffwechsels, wie beispielsweise Zymosterol, Farnesol, Geraniol, Squalen, Lanosterol, Cholesta 5,7,24-trienol und Cholesta-5,7,22,24-tetraenol sowie dessen biosynthetischen Folgeprodukte des Sterolstoffwechsels, wie Vitamin D<sub>3</sub> und Cholesterol sind Verbindungen mit hohem wirtschaftlichen Wert.

Die wirtschaftliche Bedeutung von 7-Dehydrocholesterol liegt vor allem in der Gewinnung von Vitamin D<sub>3</sub> aus 7-Dehydrocholesterol über UV-Bestrahlung.

Squalen wird als Synthesebaustein für die Synthese von Terpenen benutzt. In hydrierter Form findet es als Squalan Verwendung in Dermatologie und Kosmetik sowie in verschiedenen Derivaten als Inhaltstoff von Haut- und Haarpflegemitteln.

Weiterhin wirtschaftlich nutzbar sind Sterole, wie Zymosterol und Lanosterol, wobei Lanosterol Roh- und Synthesepivot für die chemische Synthese von Saponinen und Steroidhormonen ist. Wegen seiner guten Hautpenetration und Spreadingeigenschaften dient Lanosterol als Emulsionshilfs- und Wirkstoff für Hautcremes.

Ein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten ist daher von großer Bedeutung.

Besonders wirtschaftliche Verfahren sind biotechnologische Verfahren unter Ausnutzung von durch genetische Veränderung optimierter Organismen, die 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetische Zwischen- und/oder Folgeprodukte herstellen.

Während der Sterolstoffwechsel in Bakterien, Pilzen, Hefen und einigen Insekten im wesentlichen von Zymosterol über Fecosterol, Episterol, Ergosta-5,7-dienol und Ergosta-5,7,22,24-tetraen-3 $\beta$ -ol zu Ergosterol (Provitamin D<sub>2</sub>) führt, führt der Sterolstoffwechsel in Säugern im wesentlichen von Zymosterol über Cholesta-7,24-dienol, Lathosterol zu 7-Dehydro-Cholsterol (Provitamin D<sub>3</sub>).

7-Dehydro-Cholsterol (Provitamin D<sub>3</sub>) wird durch die 7-Dehydro-Cholesterolreduktase in Cholesterol und Cholesterol in Steroidhormone, Corticoide und Gallensäuren wie Progesteron, Testosteron, Estradiol, Aldosteron, Cortison und Cholat überführt.

Einige Gene des 7-Dehydrocholsterol-Stoffwechsels in Säugern sind bekannt und kloniert, wie beispielsweise

15 Nukleinsäuren kodierend eine humane  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase (auch Emopamil Binding Protein (EBP) genannt), *ACCESSION NM\_006579* und eine murine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase (Braverman, N. et al., (1999): Mutations in the gene encoding 3 $\beta$ -hydroxysteroid- $\Delta 8$ ,  $\Delta 7$ -isomerase  
20 cause X-linked dominant Conradi-Hunermann syndrome. *Nat. Genet.* 22(3), 291-294.,

Nukleinsäuren kodierend eine humane  $\Delta 5$ -Desaturase (auch Sterol-C5-Desaturase genannt), *ACCESSION AB016247* und eine murine  $\Delta 5$ -Desaturase (Nishi, S. et al., (2000): cDNA cloning of the mammalian  
25 sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant. *Biochim. Biophys. Acta* 1490(1-2), 106-108),

Nukleinsäuren kodierend eine humane  $\Delta 24$ -Reduktase (auch 24-Dehydrocholesterol Reduktase (DHCR24) genannt), *ACCESSION NM\_014762* und eine murine  $\Delta 24$ -Reduktase (Waterham, H.R. et al. (2001): Mutations in the 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta 24$ -reductase gene cause  
30 desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am. J. Hum. Genet.* 69(4), 685-694 und

35 Nukleinsäuren kodierend eine humane Sterol-Acyltransferase (Chang, C.C. et al., Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells, *J. Biol. Chem.* 1993, Oct  
40 5;268(28):20747-55) und eine murine Sterol-Acyltransferase (Uelmen, P.J.: Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro, *J. Biol. Chem.* 1995 Nov  
45 3;270(44):26192-201.

## 3

Die Gene des Ergosterol-Stoffwechsels in Hefe sind weitgehend bekannt und kloniert, wie beispielsweise

Nukleinsäuren kodierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase (ERG2) (Ashman, W.H. et al. (1991): Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. *Lipids*. Aug; 26(8):628-32.),

Nukleinsäuren kodierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase (ERG3) (Arthington, B.A. et al. (1991): Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene*. Jun15; 102(1):39-44.),

Nukleinsäuren kodierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase (ERG 4) (Lai, M.H. et al., (1994): The identification of a gene family in the *Saccharomyces cerevisiae* ergosterol biosynthesis pathway. *Gene*. Mar11; 140(1):41-9.),

Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase (HMG) (Bason M.E. et al, (1988) Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol Cell Biol* 8:3797-3808,

Nukleinsäuren kodierend eine trunkierte HMG-CoA-Reduktase (t-HMG) (Polakowski T, Stahl U, Lang C. (1998) Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*. Jan; 49(1):66-71,

Nukleinsäuren kodierend eine Lanosterol-C14-Demethylase (ERG11) (Kalb VF, Loper JC, Dey CR, Woods CW, Sutter TR (1986) Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 45(3):237-45,

Nukleinsäuren kodierend eine Squalensynthetase (ERG9) (Jennings, S.M., (1991): Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA*. Jul15; 88(14):6038-42),

Nukleinsäuren kodierend eine Sterol-Acyltransferase (SAT1) und (SAT2) (Yang, H.: Sterol esterification in yeast: a two-gene process. *Science*. 1996 May 31; 272(5266):1353-6.) sowie eine weitere Sterol-Acyltransferase (*J. Biol. Chem.* 1996, Sep 27; 271(39):24157-63),

Nukleinsäuren kodierend eine Squalenepoxidase (*ERG1*) (Jandrositz, A., et al (1991) The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. Gene 107:155-160),

5

Nukleinsäuren kodierend eine C24-Methyltransferase (*ERG6*) (Hardwick, K.G. et al.,: SED6 is identical to *ERG6*, and encodes a putative methyltransferase required for ergosterol synthesis. Yeast. Feb;10(2):265-9) und

10

Nukleinsäuren kodierend eine Delta22-Desaturase (*ERG5*) (Skaggs, B.A. et al.,: Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis, Gene. 1996

15 Feb22;169(1):105-9.).

Weiterhin sind Verfahren bekannt, die eine Erhöhung des Gehalts an spezifischen Intermediaten und Endprodukten des Sterolstoffwechsels in Hefen und Pilzen zum Ziel haben.

20

Es ist aus EP 486 290 bekannt, daß der Gehalt an Squalen und weiteren spezifischen Sterolen, wie beispielsweise Zymosterol in Hefen erhöht werden kann, indem man die Expressionsrate der HMG-CoA-Reduktase erhöht und gleichzeitig den Stoffwechselweg der Zymosterol-C24-Methyltransferase (*ERG6*) und der Ergosta-5,7,24(28)-trienol-22-dehydrogenase (*ERG5*) unterbricht.

25

Aus T. Polakowski, Molekularbiologische Beeinflussung des Ergosterolstoffwechsels der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Shaker Verlag Aachen, 1999, Seite 59 bis 66 ist bekannt, daß die Erhöhung der Expressionsrate der HMG-CoA-Reduktase alleine ohne Unterbrechung des abfließenden Stoffwechselstromes wie in EP 486 290 lediglich zu einer leichten Erhöhung des Gehalts an frühen Sterolen, sowie Squalen führt, während sich der Gehalt an späteren Sterolen, wie Ergosterol nicht signifikant ändert, bzw. bei Ergosterol sogar tendenziell abnimmt.

30

35

WO 99/16886 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Ergosterol in Hefen, die eine Kombination der Gene *tHMG*, *ERG9*, *SAT1* und *ERG1* überexprimieren.

40

Tainaka et al., J, Ferment. Bioeng. 1995, 79, 64-66, beschreiben ferner, daß die Überexpression von *ERG11* (Lanosterol-C14-Demethylase) zu einer Anreicherung von 4,4-Dimethylzymosterol jedoch nicht von Ergosterol führt. Die Transformante zeigte gegenüber

45

dem Wildtyp einen, je nach Fermentationsbedingungen, um den Faktor 1,1 bis 1,47 gesteigerten Zymosterolgehalt.

Avruch et al, Can.J.Biochem 1976, 54(7), 657-665 sowie Xu et al, 5 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988, 155(1), 509-517 beschreiben, daß durch spezifische Hemmung der C24-Methyltransferase und auch durch eine Mutation am Genlocus *erg6* in *S. cerevisiae* neben Zymosterol, auch Spuren von Cholesterol nachzuweisen sind.

10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zu Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten mit vorteilhaften Eigenschaften, wie einer höheren Produktausbeute, zur Verfügung zu stellen.

15

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten gefunden, indem man Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Ak- 20 tivitäten, ausgewählt aus der Gruppe  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen.

Eine erhöhte Aktivität gegenüber dem Wildtyp bedeutet für den Fall, daß der Ausgangsorganismus diese Aktivität nicht aufweist, 25 daß die Aktivität verursacht wird. Für den Fall, daß der Ausgangsorganismus die Aktivität bereits aufweist, bedeutet eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Aktivität eine um einen Prozentsatz erhöhte Aktivität.

30 Unter  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, auch  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Sterolisomerase genannt, verstanden.

Unter einer  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Zymosterol in Chole- 35 sta-7,24-dienol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase umgesetzte Menge Zymosterol bzw. gebildete Menge Cholesta-7,24-dienol ver- 40 standen.

Bei einer erhöhten  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase die umgesetzte Menge Zymosterol 45 bzw. die gebildete Menge Cholesta-7,24-dienol erhöht.



Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere  
5 mindestens 600% der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität des Wildtyps.

Unter  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\Delta 5$ -Desaturase, auch Lathosterol-5-desaturase oder Sterol-C5-Desaturase genannt, verstanden.

10

Unter einer  $\Delta 5$ -Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Cholesta-7,24-dienol in Cholesta-5,7,24-trienol umzuwandeln.

15 Dementsprechend wird unter  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\Delta 5$ -Desaturase umgesetzte Menge Cholesta-7,24-dienol bzw. gebildete Menge Cholesta-5,7,24-trienol verstanden.

20 Bei einer erhöhten  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\Delta 5$ -Desaturase die umgesetzte Menge Cholesta-7,24-dienol bzw. die gebildete Menge Cholesta-5,7,24-trienol erhöht.

25

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere

30 mindestens 600% der  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität des Wildtyps.

Unter  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\Delta 24$ -Reduktase, auch 24-Dehydrocholesterol-Reduktase genannt, verstanden.

35

Unter einer  $\Delta 24$ -Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, die Doppelbindung zwischen C24 und C25 von Cholesterol-Verbindungen in eine Einfachbindung zu überführen, wie beispielsweise Cholesta-5,7,24-trienol in 7-Dehydrocholesterol oder Zymosterol in Lathosterol oder Cholesta-7,24-dienol in Cholesta-7-enol umzuwandeln.

40

Dementsprechend wird unter  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität vorzugsweise die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\Delta 24$ -Reduktase umgesetzte Menge Cholesta-5,7,24-trienol bzw. gebildete Menge 7-Dehydrocholesterol verstanden.

45

Bei einer erhöhten  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\Delta 24$ -Reduktase die umgesetzte Menge Cholesta-5,7,24-trienol bzw. die gebildete Menge 7-Dehydrocholesterol 5 erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter 10 mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität des Wildtyps.

Unter einem Wildtyp wird der entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangsorganismus verstanden. Vorzugsweise und insbesondere in Fällen in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht 15 eindeutig zuordenbar ist, wird unter Wildtyp für die Erhöhung der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, die Erhöhung der  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, die Erhöhung der  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, die Reduzierung der nachstehend beschriebenen C24-Methyltransferase-Aktivität, 20 die Reduzierung der nachstehend beschriebenen  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Squalenepoxidase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend 25 beschriebenen Squalensynthetase-Aktivität und die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Sterol-Acyltransferase-Aktivität sowie für die Erhöhung des Gehalts an 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten ein Referenzorganismus verstanden. Dieser Referenzorganismus 30 ist vorzugsweise der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* AH22.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, 35  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität oder  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität 40 aufweisen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weisen die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens zwei der Aktivitäten, ausgewählt aus 45 der Gruppe  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität auf.

Besonders bevorzugte Kombinationen sind eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität und  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität,  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität sowie eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weisen die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität auf.

Die Erhöhung der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität sowie der der nachstehend beschriebenen HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität, Squalensynthetase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität kann unabhängig voneinander durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, also Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase,  $\Delta 5$ -Desaturase,  $\Delta 24$ -Reduktase, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäure gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung der entsprechenden Gene durch Aktivatoren, also durch Induzierung des  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gens, des  $\Delta 5$ -Desaturase-Gens, des  $\Delta 24$ -Reduktase-Gens, des HMG-CoA-Reduktase-Gens, des Lanosterol-C14-Demethylase-Gens, des Squalenepoxidase-Gens, des Squalensynthetase-Gens oder des Sterol-Acyltransferase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien der entsprechenden Nukleinsäuren, also durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase,  $\Delta 5$ -Desaturase,  $\Delta 24$ -Reduktase, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase in den Organismus.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase,  $\Delta 5$ -Desaturase,  $\Delta 24$ -Reduktase, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus eigenen, insbesondere der Hefen eigenen, endogenen  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerasen,  $\Delta 5$ -Desaturasen,  $\Delta 24$ -Reduktasen, HMG-CoA-Reduktasen, Lanosterol-C14-Demethyl-

lasen, Squalenepoxidasen, Squalensynthetasen oder Sterol-Acyltransferasen verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase,  $\Delta 5$ -Desaturase,  $\Delta 24$ -Reduktase, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des entsprechenden Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase,  $\Delta 5$ -Desaturase,  $\Delta 24$ -Reduktase, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Desweiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression endogener  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-,  $\Delta 5$ -Desaturase-,  $\Delta 24$ -Reduktase-, HMG-CoA-Reduktase-, Lanosterol-C14-Demethylase-, Squalenepoxidase-, Squalensynthetase- oder Sterol-Acyltransferase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase durch Einbringen von einer oder mehrerer Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase codiert, verwendet werden.

Bei genomischen  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage

versetzt werden kann, die entsprechenden  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

- 5 Beispiele für  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine murine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 1, Protein: Seq. ID. No. 2) oder eine humane  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 3, Protein: Seq. ID. No. 4) (Braverman, N. et al., (1999): Mutations in the gene encoding 3 $\beta$ -hydroxysteroid- $\Delta 8$ ,  $\Delta 7$ -isomerase cause X-linked dominant Conradi-Hunermann syndrome, Nat. Genet. 22(3), 291-294), aber auch Nukleinsäuren die Proteine codieren, die beispielsweise aufgrund einer breiten Substratspezifität die Aktivität einer  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase aufweisen, wie beispielsweise Nukleinsäuren, codierend eine C8-Isomerase aus *Saccharomyces cerevisiae* (ERG2), Nukleinsäure: Seq. ID. No. 5, Protein: Seq. ID. No. 6), (Ashman, W.H. et al. (1991): Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. Lipids. Aug; 26(8): 628-32.).
- 20 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gen vor.

- Die Anzahl der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

- Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

- Bevorzugte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gene sind Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, die eine hohe Substratspezifität für Zymosterol aufweisen. Demnach sind insbesondere  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gene und die entsprechenden  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerasen aus Säugetieren und deren funktionelle Äquivalente bevorzugt.

- Dementsprechend bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase aufweisen.

## 11

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Aminosäuresequenz der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase aus *Mus musculus* dar.

Weitere Beispiele für  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerasen und  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gene  
5 lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 2 leicht auffinden.

10

Die  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase aus *Homo sapiens* (Seq. ID. No. 4) weist beispielsweise mit der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase aus *Mus musculus* (Seq. ID. No. 2) eine Identität von 74 % auf.

15 Weitere Beispiele für  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerasen und  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 1 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

20

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche  
25 liche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte  
30 Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptid-  
35 kette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinelänge verstanden,  
40 insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung fol-  
45 gender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap penalty 10

Gap length penalty 10

Pairwise alignment parameter:

5 K-tuple 1

Gap penalty 3

Window 5

Diagonals saved 5

- 10 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz
- 15 eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase aus *Mus musculus* (SEQ. ID. NO. 2).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

25

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht

30 ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

35

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 in den Organismus ein.

- 40 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die cDNA aus *Mus musculus* dar, die die  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase der Sequenz SEQ ID NO. 2 codiert.

Alle vorstehend erwähnten  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine

45 der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligo-

- nukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.
- 5
- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase.
- 15 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase durch Einbringen von einer oder mehrerer Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase in den Organismus.
- 20 Dazu kann prinzipiell jedes  $\Delta 5$ -Desaturase-Gen, also jede Nukleinsäure die eine  $\Delta 5$ -Desaturase codiert, verwendet werden.

- Bei genomischen  $\Delta 5$ -Desaturase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß
- 25 der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden  $\Delta 5$ -Desaturase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.
- 30 Beispiele für  $\Delta 5$ -Desaturase-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine murine  $\Delta 5$ -Desaturase (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 7, Protein: Seq. ID. No. 8 oder eine humane  $\Delta 5$ -Desaturase (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 9, Protein: Seq. ID. No. 10) (Nishi, S. et al., (2000): cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the ex-
- 35 pression in yeast mutant. Biochim. Biophys. Acta, 1490, (1-2), 106-108), aber auch Nukleinsäuren die Proteine codieren, die beispielsweise aufgrund einer breiten Substratspezifität die Aktivität einer  $\Delta 5$ -Desaturase aufweisen, wie beispielsweise Nukleinsäuren, codierend eine C5-Desaturase aus *Saccharomyces cerevisiae*
- 40 (ERG3), (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 11, Protein: Seq. ID. No. 12), (Arthington, B.A. et al. (1991): Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. Gene. Jun15;102(1):39-44.).



In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres  $\Delta 5$ -Desaturase-Gen vor.

- 5 Die Anzahl der  $\Delta 5$ -Desaturase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.
- 10 Bevorzugte  $\Delta 5$ -Desaturase-Gene sind Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, die eine hohe Substratspezifität für Cholesta-7,24-dienol aufweisen. Demnach sind insbesondere  $\Delta 5$ -Desaturase-Gene und die entsprechenden  $\Delta 5$ -Desaturasen aus Säugetieren und deren funktionellen Äquivalente bevorzugt.
- 15 Dementsprechend bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abge-
- 20 leitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\Delta 5$ -Desaturase aufweisen.
- 25 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 8 stellt die Aminosäuresequenz der  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Mus musculus* dar.
- Weitere Beispiele für  $\Delta 5$ -Desaturasen und  $\Delta 5$ -Desaturase-Gene lassen
- 30 sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 2 leicht auffinden.
- 35 Die  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Homo sapiens* (Seq. ID. No. 10) weist beispielsweise mit der  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Mus musculus* (Seq. ID. No. 8) eine Identität von 84% auf.
- Weitere Beispiele für  $\Delta 5$ -Desaturasen und  $\Delta 5$ -Desaturase-Gene lassen
- 40 sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 7 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.
- 45 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Ver-

gleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

5 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Mus musculus* (SEQ. ID. NO. 8).

10 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend  
15 der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

20 Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine  
25 Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 7 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 7 stellt die cDNA aus *Mus musculus* dar, die die  $\Delta 5$ -Desaturase der Sequenz SEQ ID NO. 8 codiert.

30

Alle vorstehend erwähnten  $\Delta 5$ -Desaturase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Dop-

35 pelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-  
40 Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase.

5

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase durch Einbringen von einer oder mehrer Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase in den Organismus.

10

Dazu kann prinzipiell jedes  $\Delta 24$ -Reduktase-Gen, also jede Nukleinsäure die eine  $\Delta 24$ -Reduktase codiert, verwendet werden.

Bei genomischen  $\Delta 24$ -Reduktase-Nukleinsäure-Sequenzen aus euka-

15 ryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden  $\Delta 24$ -Reduktase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20

Beispiele für  $\Delta 24$ -Reduktase-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine murine  $\Delta 24$ -Reduktase (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 13, Protein: Seq. ID. No. 14 oder eine humane  $\Delta 24$ -Reduktase (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 15, Protein: Seq. ID. No. 16), (Waterham, H.R.

25 et al.: Mutations in the 3beta-Hydroxysterol Delta24-Reductase Gene Cause Desmosterolosis, an Autosomal Recessive Disorder of Cholesterol Biosynthesis, Am. J. Hum. Genet. 69 (4), 685-694 (2001)), aber auch Nukleinsäuren die Proteine codieren, die beispielsweise aufgrund einer breiten Substratspezifität die Aktivität einer  $\Delta 24$ -Reduktase aufweisen, wie beispielsweise Nukleinsäuren, codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase aus *Saccharomyces cerevisiae* (ERG4), (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 17, Protein: Seq. ID. No. 18), (Lai, M.H. et al., (1994): The identification of a gene family in the *Saccharomyces cerevisiae* ergosterol biosynthesis  
35 pathway. Gene. Mar 11; 140(1):41-9.).

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres  $\Delta 24$ -Reduktase-Gen vor.

40

Die Anzahl der  $\Delta 24$ -Reduktase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

45

Bevorzugte  $\Delta 24$ -Reduktase-Gene sind Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, die eine hohe Substratspezifität für Cholesta-5,7,24-trienol aufweisen. Demnach sind insbesondere  $\Delta 24$ -Reduktase-Gene und die entsprechenden  $\Delta 24$ -Reduktasen aus Säugetieren und deren funktionellen Äquivalente bevorzugt.

Dementsprechend bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 14 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\Delta 24$ -Reduktase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 14 stellt die Aminosäuresequenz der  $\Delta 24$ -Reduktase aus *Mus musculus* dar.

Weitere Beispiele für  $\Delta 24$ -Reduktasen und  $\Delta 24$ -Reduktase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 14 leicht auffinden.

Die  $\Delta 24$ -Reduktase aus *Homo sapiens* (Seq. ID. No. 16) weist beispielsweise mit der  $\Delta 24$ -Reduktase aus *Mus musculus* (Seq. ID. No. 14) eine Identität von 96% auf.

Weitere Beispiele für  $\Delta 24$ -Reduktasen und  $\Delta 24$ -Reduktase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 13 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\Delta 24$ -Reduktase aus *Mus musculus* (SEQ. ID. NO. 14).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

10

Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

- 15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 13 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 13 stellt die genomische DNA aus *Mus musculus* dar, die die  $\Delta 24$ -Reduktase der Sequenz SEQ ID NO. 14 codiert.

- Alle vorstehend erwähnten  $\Delta 24$ -Reduktase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 25 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben. 30 35 ben.

- In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen genetischen Veränderungen 40 rungen eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe C24-Methyltransferase-Aktivität und  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen genetischen Veränderungen eine redu- 45

zierte C24-Methyltransferase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta$ 22-Desaturase-Aktivität aufweisen.

Unter einer reduzierten Aktivität wird sowohl die reduzierte als  
5 auch das komplette Ausschalten der Aktivität verstanden. Eine Reduzierung einer Aktivität umfasst demnach auch eine mengenmäßige Verringerung des entsprechenden Proteins in dem Organismus bis hin zu einem vollständigen Fehlen des entsprechenden Proteins, beispielsweise zu testen durch eine fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Enzymaktivität oder eine fehlende immunologische Nachweisbarkeit der entsprechenden Proteine.  
10

Unter C24-Methyltransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer C24-Methyltransferase verstanden.

15

Unter einer C24-Methyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Zymosterol in Fecosterol (Ergosta-8,24(28)dienol umzuwandeln.

20 Dementsprechend wird unter C24-Methyltransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein C24-Methyltransferase umgesetzte Menge Zymosterol bzw. gebildete Menge Fecosterol verstanden.

25 Bei einer reduzierten C24-Methyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein C24-Methyltransferase die umgesetzte Menge Zymosterol bzw. die gebildete Menge Fecosterol reduziert.

30 Vorzugsweise erfolgt diese Reduzierung der C24-Methyltransferase-Aktivität auf mindestens 90%, weiter bevorzugt auf mindestens 70%, weiter bevorzugt auf mindestens 50%, weiter bevorzugt auf mindestens 30%, bevorzugter auf mindestens 10%, noch bevorzugter auf mindestens 5%, insbesondere auf 0% der C24-Methyltransferase-Aktivität des Wildtyps. Besonders bevorzugt ist demnach ein Ausschalten der C24-Methyltransferase-Aktivität im Organismus.  
35

Unter  $\Delta$ 22-Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\Delta$ 22-Desaturase verstanden.

40

Unter einer  $\Delta$ 22-Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Ergosta-5,7-dienol in Ergosta-5,7,22,24-tetraen-3 $\beta$ -ol umzuwandeln.

45

Dementsprechend wird unter  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\Delta 22$ -Desaturase umgesetzte Menge Ergosta-5,7-dienol bzw. gebildete Menge Ergosta-5,7,22,24-tetraen-3 $\beta$ -ol verstanden.

5

Bei einer reduzierten  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\Delta 22$ -Desaturase die umgesetzte Menge Ergosta-5,7-dienol bzw. die gebildete Menge Ergosta-5,7,22,24-te-

10 traen-3 $\beta$ -ol reduziert.

Vorzugsweise erfolgt diese Reduzierung der  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität auf mindestens 90%, weiter bevorzugt auf mindestens 70%, weiter bevorzugt auf mindestens 50%, weiter bevorzugt auf mindestens 30%, bevorzugter auf mindestens 10%, noch bevorzugter auf mindestens 5%, insbesondere auf 0% der  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität des Wildtyps. Besonders bevorzugt ist demnach ein Ausschalten der  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität im Organismus.

- 20 Die Reduzierung der C24-Methyltransferase-Aktivität und/oder  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität kann unabhängig voneinander durch unterschiedliche zellbiologische Mechanismen erfolgen, beispielsweise durch Inhibition der entsprechenden Aktivität auf Proteinebene, beispielsweise durch Zugabe von Inhibitoren der entsprechenden
- 25 Enzyme oder durch Reduzierung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, codierend eine C24-Methyltransferase oder  $\Delta 22$ -Desaturase, gegenüber dem Wildtyp.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der C24-Methyltransferase- und/oder  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Reduzierung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, codierend eine C24-Methyltransferase oder  $\Delta 22$ -Desaturase.

- 35 Die Reduzierung der Genexpression der Nukleinsäuren, codierend eine C24-Methyltransferase oder  $\Delta 22$ -Desaturase, gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch

- 40 a) Einbringen von Nukleinsäuresequenzen, welche zu einer antisense-Nukleinsäuresequenz transkribierbar sind, die zur Inhibition der C24-Methyltransferase-Aktivität und/oder  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität befähigt ist, beispielsweise indem sie die Expression von endogener C24-Methyltransferase und/oder  $\Delta 22$ -Desaturase-Akti-
- 45 vität inhibiert,

- b) die zu Kosuppression führende Überexpression homologer C24-Methyltransferase- und/oder  $\Delta 22$ -Desaturase-Nukleinsäuresequenzen,
- c) die Einführung von Nonsense-Mutationen in das Endogen mittels  
5 Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in den Organismus,
- d) durch das Einbringen von spezifischen DNA-bindenden Faktoren, beispielsweise Faktoren vom Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren, die eine Reduzierung der Genexpression bewirken oder  
10
- e) die Generierung von Knockout-Mutanten, beispielsweise mit Hilfe von T-DNA-Mutagenese oder homologer Rekombination.

- In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der Genexpression der Nukleinsäuren, codierend eine C24-Methyltransferase oder  $\Delta 22$ -Desaturase durch Generierung von Knockout-Mutanten, besonders bevorzugt durch homologe Rekombination.
- 15
- 20 Demnach wird bevorzugt ein Organismus verwendet, der kein funktionelles C24-Methyltransferase- und/oder  $\Delta 22$ -Desaturase-Gen aufweist.

- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Generierung von  
25 Knockout-Mutanten, also die Deletion des Ziellocus C24-Methyltransferase- und/oder  $\Delta 22$ -Desaturase-Gen bei gleichzeitiger Integration einer Expressionskassette, enthaltend mindestens eine der vorstehend oder nachstehend beschriebenen Nukleinsäuren, codierend ein Protein dessen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp erhöht  
30 wird, durch homologe Rekombination.

- Dazu können Nukleinsäurekonstrukte verwendet werden, die neben den nachstehend beschriebenen Expressionskassetten, enthaltend Promotor, kodierende Sequenz und gegebenenfalls Terminator und  
35 neben einem nachstehend beschriebenen Selektionsmarker am 3'- und 5'-Ende Nukleinsäuresequenzen enthalten, die mit Nukleinsäuresequenzen am Anfang und am Ende des zu deletierenden Gens identisch sind.

- 40 Vorzugsweise kann der Selektionsmarker nach der Selektion durch Rekombinase-Systeme wieder entfernt werden, beispielsweise durch loxP-Signale am 3'- und 5'-Ende des Selektionsmarkers unter Verwendung einer Cre-Rekombinase (Cre-LoxP-System).
- 45 Im bevorzugten Organismus *Saccharomyces cerevisiae* bedeutet das C24-Methyltransferase-Gen das Gen *ERG6* (SEQ. ID. NO. 19). SEQ. ID. NO. 20 stellt die entsprechende C24-Methyltransferase aus



*Saccharomyces cerevisiae* dar (Hardwick, K.G. et al.,: SED6 is identical to ERG6, and encodes a putative methyltransferase required for ergosterol synthesis. Yeast. Feb; 10(2): 265-9).

- 5 Im bevorzugten Organismus *Saccharomyces cerevisiae* bedeutet das  $\Delta$ 22-Desaturase-Gen das Gen *ERG5* (SEQ. ID. NO. 21). SEQ. ID. NO. 22 stellt die entsprechende  $\Delta$ 22-Desaturase aus *Saccharomyces cerevisiae* dar (Skaggs, B.A. et al.,: Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis, Gene. 1996 Feb 22; 169(1): 105-9.).

- 15 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Organismen kultiviert, die zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Desmethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität, Squalensynthetase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

- 20 Unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase) verstanden.

- 25 Unter einer HMG-CoA-Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A in Mevalonat umzuwandeln.

- 30 Dementsprechend wird unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. gebildete Menge Mevalonat verstanden.

- 35 Bei einer erhöhten HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase die umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. die gebildete Menge Mevalonat erhöht.

- 40 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität des Wild-
- 45 typs.

## 23

Unter Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Lanosterol-C14-Demethylase verstanden.

Unter einer Lanosterol-C14-Demethylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lanosterol in 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Lanosterol-C14-Demethylase umgesetzte Menge Lanosterol bzw. gebildete Menge 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol verstanden.

Bei einer erhöhten Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Lanosterol-C14-Demethylase die umgesetzte Menge Lanosterol bzw. die gebildete Menge 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität des Wildtyps.

25

Unter Squalenepoxidase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Squalenepoxidase verstanden.

Unter einer Squalenepoxidase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Squalen in Squalenepoxid umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Squalenepoxidase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Squalenepoxidase umgesetzte Menge Squalen bzw. gebildete Menge Squalenepoxid verstanden.

Bei einer erhöhten Squalenepoxidase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Squalenepoxidase die umgesetzte Menge Squalen bzw. die gebildete Menge Squalenepoxid erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Squalenepoxidase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der Squalenepoxidase-Aktivität des Wildtyps.

## 24

Unter Squalensynthetase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Squalensynthetase verstanden.

Unter einer Squalensynthetase wird ein Protein verstanden, das  
5 die enzymatische Aktivität aufweist, Farnesylpyrophosphat in Squalen umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Squalensynthetase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Squalensynthetase umge-  
10 setzte Menge Farnesylpyrophosphat bzw. gebildete Menge Squalen verstanden.

Bei einer erhöhten Squalensynthetase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten  
15 Zeit durch das Protein Squalensynthetase die umgesetzte Menge Farnesylpyrophosphat bzw. die gebildete Menge Squalen erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Squalensynthetase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der Squalensynthetase-Aktivität des Wild-  
20 typs.

25 Unter Sterol-Acyltransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Sterol-Acyltransferase verstanden.

Unter einer Sterol-Acyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 7-Dehydrocholesterol in  
30 in entsprechendes acetyliertes 7-Dehydrocholesterol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Sterol-Acyltransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Sterol-Acyltransferase umgesetzte Menge 7-Dehydrocholesterol bzw. gebildete Menge acety-  
35 liertes 7-Dehydrocholesterol verstanden.

Bei einer erhöhten Sterol-Acyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Sterol-Acyltransferase die umgesetzte  
40 Menge 7-Dehydrocholesterol bzw. die gebildete Menge acetyliertes 7-Dehydrocholesterol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Sterol-Acyltransferase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter  
45 bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, ins-

besondere mindestens 600% der Sterol-Acyltransferase-Aktivität des Wildtyps.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der  
5 HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsge-  
10 mäßigen Verfahrens erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase indem man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase in den Organismus einbringt, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp, einer redu-  
15 zierten Regulation unterliegt.

Unter einer reduzierten Regulation verglichen mit dem Wildtyp, wird eine im Vergleich zum vorstehend definierten Wildtyp verringerte, vorzugsweise keine Regulation auf Expressions- oder Pro-  
20 teinebene verstanden.

Die reduzierte Regulation kann vorzugsweise durch einen im Nukleinsäurekonstrukt mit der kodierenden Sequenz funktionell verknüpften Promotor erreicht werden, der in dem Organismus,  
25 verglichen mit dem Wildtyp-Promoter einer reduzierten Regulation unterliegt.

Beispielsweise unterliegt der mittlere ADH-Promotor in Hefe nur eine reduzierten Regulation und ist daher insbesondere als Promo-  
30 tor im vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukt bevorzugt.

Dieses Promotorfragment des *ADH12s* Promotors, im folgenden auch *ADH1* bezeichnet, zeigt eine annähernd konstitutive Expression (Ruohonen L, Penttilä M, Keranen S. (1991) Optimization of Bacil-  
35 lus alpha-amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. May-Jun;7(4):337-462; Lang C, Looman AC. (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. Dec;44(1-2):147-56.), so daß die transkriptionelle Regulation  
40 nicht mehr über Intermediate der Ergosterolbiosynthese abläuft.

Weitere bevorzugte Promotoren mit reduzierter Regulation sind konstitutive Promotoren wie beispielsweise der *TEF1*-Promotor aus Hefe, der *GPD*-Promotor aus Hefe oder der *PGK*-Promotor aus Hefe  
45 (Mumberg D, Muller R, Funk M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene. 1995 Apr 14;156(1):119-22; Chen CY, Oppermann

H, Hitzeman RA. (1984) Homologous versus heterologous gene expression in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. Dec 11;12(23):8951-70.).

- 5 Die reduzierte Regulation kann in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dadurch erreicht werden, daß man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit der Organismus eigenen, orthologen Nukleinsäure, einer reduzierten Regulation  
10 unterliegt.

- Besonders bevorzugt ist die Verwendung einer Nukleinsäure, die nur den katalytischen Bereich der HMG-CoA-Reduktase kodiert (trunkierte (t-)HMG-CoA-Reduktase) als Nukleinsäure, codierend  
15 eine HMG-CoA-Reduktase. Diese in EP 486 290 und WO 99/16886 beschriebene Nukleinsäure (t-HMG) kodiert nur den katalytisch aktiven Teil der HMG-CoA-Reduktase, die für die Regulation auf Proteinebene verantwortliche Membran-Domäne fehlt. Diese Nukleinsäure unterliegt somit, insbesondere in Hefe, einer reduzierten  
20 Regulation und führt zu einer Erhöhung der Genexpression der HMG-CoA-Reduktase.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man Nukleinsäuren, vorzugsweise via vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt, ein, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 24 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 24, und die die enzymatische  
30 Eigenschaft einer HMG-CoA-Reduktase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 24 stellt die Aminosäuresequenz der trunkierten HMG-CoA-Reduktase (t-HMG) dar.

- 35 Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und damit auch für die auf den katalytischen Bereich reduzierten t-HMG-CoA-Reduktasen bzw. die kodierenden Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden  
40 den rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 24 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und damit auch für die auf den katalytischen Bereich reduzierten t-HMG-CoA-Reduktasen  
45 bzw. die kodierenden Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 23 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybrid-

sierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Besonders bevorzugt verwendet man eine Nukleinsäure, enthaltend  
5 die Sequenz SEQ. ID. NO. 23 als Nukleinsäure, kodierend eine trunkierte HMG-CoA-Reduktase.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die reduzierte Regulation dadurch erreicht, daß man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, deren  
10 Expression in dem Organismus, verglichen mit der Organismus eigenen, orthologen Nukleinsäure, einer reduzierten Regulation unterliegt und einen Promotor verwendet, der in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp-Promoter einer reduzierten Regulation  
15 unterliegt.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine  
20 Lanosterol-C14-Demethylase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase durch Einbringen von einer oder mehrer Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase in den Organismus.  
25

Dazu kann prinzipiell jedes Lanosterol-C14-Demethylase-Gen (ERG11), also jede Nukleinsäuren die eine Lanosterol-C14-Demethylase codiert, verwendet werden. Bei genomischen Lanosterol-C14-Demethylase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Lanosterol-C14-Demethylase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie  
35 die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Lanosterol-C14-Demethylase-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Kalb VF, Loper JC, Dey CR, Woods CW, Sutter TR (1986) Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 45(3):237-45), *Candida albicans* (Lamb DC, Kelly DE, Baldwin BC, Gozzo F, Boscott P, Richards WG, Kelly SL (1997) Differential inhibition of *Candida albicans* CYP51 with  
45 azole antifungal stereoisomers. FEMS Microbiol Lett 149(1):25-30), *Homo sapiens* (Stromstedt M, Rozman D, Waterman MR. (1996) The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol

14 alpha-demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. Arch Biochem Biophys 1996 May 1;329(1):73-81c) oder *Rattus norvegicus*, Aoyama Y, Funae Y, Noshiro M, Horiuchi T, Yoshida Y. (1994) Occurrence of a P450 showing high homology to yeast lanosterol 14-demethylase (P450(14DM)) in the rat liver. Biochem Biophys Res Commun. Jun 30;201(3):1320-6)

10 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Lanosterol-C14-Demethylase-Gen vor.

Die Anzahl der Lanosterol-C14-Demethylase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

Bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 26 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 26, und die die enzymatische Eigenschaft einer Lanosterol-C14-Demethylase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 26 stellt die Aminosäuresequenz der Lanosterol-C14-Demethylase aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

30 Weitere Beispiele für Lanosterol-C14-Demethylasen und Lanosterol-C14-Demethylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 26 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Lanosterol-C14-Demethylasen und Lanosterol-C14-Demethylase-gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 25 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

45 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 26 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Ver-

gleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 26, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

- 5 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Lanosterol-C14-Demethylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. NO. 26).
- 10 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.
- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend
- 15 der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 20 Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine
- 25 Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 25 in den Organismus ein.

- Die Sequenz SEQ. ID. NO. 25 stellt die genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (ORF S0001049) dar, die die Lanosterol-
- 30 C14-Demethylase der Sequenz SEQ ID NO. 26 codiert.

- Alle vorstehend erwähnten Lanosterol-C14-Demethylase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkonden-
- 35 sation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer
- 40 Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.



In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Squalenepoxidase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalenepoxidase.

5

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalenepoxidase durch Einbringen von einer oder mehrer Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase in den Organismus.

10

Dazu kann prinzipiell jedes Squalenepoxidase-Gen (ERG1), also jede Nukleinsäuren die eine Squalenepoxidase codiert, verwendet werden. Bei genomischen Squalenepoxidase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den

15 Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Squalenepoxidase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20 Beispiele für Nukleinsäuren kodierend eine Squalenepoxidase sind Nukleinsäuren, codierend eine Squalenepoxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Jandrositz, A., et al (1991) The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. Gene 107:155-160, aus *Mus musculus* (Kosuga K, Hata S,

25 Osumi T, Sakakibara J, Ono T. (1995) Nucleotide sequence of a cDNA for mouse squalene epoxidase, *Biochim Biophys Acta*, Feb 21;1260(3):345-8b), aus *Rattus norvegicus* (Sakakibara J, Watanabe R, Kanai Y, Ono T. (1995) Molecular cloning and expression of rat squalene epoxidase. *J Biol Chem* Jan 6;270(1):17-20c) oder aus

30 *Homo sapiens* (Nakamura Y, Sakakibara J, Izumi T, Shibata A, Ono T. (1996) Transcriptional regulation of squalene epoxidase by sterols and inhibitors in HeLa cells., *J. Biol. Chem.* 1996, Apr 5;271(14):8053-6).

35 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Squalenepoxidase vor.

Die Anzahl der Squalenepoxidase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

Bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 28 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete

Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 28, und die die enzymatische Eigenschaft einer Squalenepoxidase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 28 stellt die Aminosäuresequenz der Squalenepoxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

- 10 Weitere Beispiele für Squalenepoxidasen und Squalenepoxidase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 28 leicht auf-  
15 finden.

- Weitere Beispiele für Squalenepoxidase und Squalenepoxidase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 27 aus verschiedenen Organismen deren genomische  
20 Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die  
25 Aminosäuresequenz der Squalenepoxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. NO. 28).

- Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.  
30

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen  
35 anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.  
40

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 27 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 27 stellt die genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YGR175C) dar, die die Squalenepoxidase der Sequenz SEQ. ID. NO. 28 codiert.

- 5 Alle vorstehend erwähnten Squalenepoxidase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligo-
- 10 nukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie
- 15 allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der
- 20 Squalensynthetase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalensynthetase.

- In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung
- 25 der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalensynthetase durch Einbringen von einer oder mehrer Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase in den Organismus.

- Dazu kann prinzipiell jedes Squalensynthetase-Gen (ERG9), also
- 30 jede Nukleinsäuren die eine Squalensynthetase codiert, verwendet werden. Bei genomischen Squalensynthetase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Squalensynthetase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.
- 35

- Beispiele für Nukleinsäuren kodierend eine Squalensynthetase sind Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus *Saccharomyces*
- 40 *cerevisiae* (ERG9), (Jennings, S.M., (1991): Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. Proc Natl Acad Sci USA. Jul15;88(14):6038-42), Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus *Botryococcus braunii* Okada (Devarrenne, T.P. et al.: Molecular characterization of squalene synthase from the green microalga *Botryococcus braunii*, race B, Arch. Biochem. Biophys. 2000, Jan15, 373(2):307-17), Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus *Potato tuber* (Yoshioka H. et
- 45

al.: cDNA cloning of sesquiter penecyclase and squalene synthase, and expression of the genes in potato tuber infected with *Phytophthora infestans*, Plant. Cell. Physiol. 1999, Sep; 40(9):993-8) oder Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus *Glycyrrhiza glabra* (Hayashi, H. et al.: Molecular cloning and characterization of two cDNAs for Glycyrrhiza glabra squalene synthase, Biol. Pharm. Bull. 1999, Sep; 22(9):947-50.

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Squalensynthetase-Gen vor.

Die Anzahl der Squalensynthetase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

Bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 30 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 30, und die die enzymatische Eigenschaft einer Squalensynthetase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 30 stellt die Aminosäuresequenz der Squalensynthetase (ERG9) aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

Weitere Beispiele für Squalensynthetasen und Squalensynthetase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 30 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Squalensynthetase und Squalensynthetase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 29 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Squalensynthetase aus *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. NO. 30).

- 5 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.
- 10 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 15 Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.
- 20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 29 in den Organismus ein.
- Die Sequenz SEQ. ID. NO. 29 stellt die genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YHR190W) dar, die die Squalensynthetase der Sequenz SEQ. ID. NO. 30 codiert.
- 25 Alle vorstehend erwähnten Squalensynthetase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press
- 30 New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor
- 35 Laboratory Press, beschrieben.
- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Sterol-Acyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Sterol-Acyltransferase.
- 45

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Sterol-Acyltransferase durch Einbringen von einer oder mehrerer Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase in den Organismus.

5

Dazu kann prinzipiell jedes Sterol-Acyltransferase-Gen (SAT1 oder SAT2), also jede Nukleinsäure die eine Sterol-Acyltransferase codiert, verwendet werden. Bei genomischen Sterol-Acyltransferase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Sterol-Acyltransferase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

15

Beispiele für Nukleinsäuren kodierend eine Sterol-Acyltransferase sind Nukleinsäuren, codierend eine Sterol-Acyltransferase aus *Saccharomyces cerevisiae* (SAT1) oder (SAT2), (Yang, H.: Sterol esterification in yeast: a two-gene process. Science. 1996 May 31;272(5266):1353-6.), eine weitere Nukleinsäure, codierend eine weitere Sterol-Acyltransferase aus *Saccharomyces cerevisiae* (J. Biol. Chem. 1996, Sep 27;271(39):24157-63), Nukleinsäuren kodierend eine humane Sterol-Acyltransferase (Chang, C.C. et al., Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells, J. Biol. Chem. 1993, Oct 5;268(28):20747-55) und Nukleinsäuren kodierend eine murine Sterol-Acyltransferase (Uelmen, P.J.: Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro, J. Biol. Chem. 1995 Nov 3;270(44):26192-201).

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Sterol-Acyltransferase vor.

Die Anzahl der Sterol-Acyltransferase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

Bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 32 oder SEQ. ID. NO. 50 oder eine von diesen Sequenzen durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens

## 36

30%, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 32 oder SEQ. ID. NO. 50, und die die enzymatische Eigenschaft einer Sterol-Acyl-  
5 transferase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 32 stellt die Aminosäuresequenz der Sterol-Acyltransferase SAT1 aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

10 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 50 stellt die Aminosäuresequenz der Sterol-Acyltransferase SAT2 aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

SAT1 und SAT2 unterscheiden sich durch eine unterschiedliche Substratspezifität.

15

Weitere Beispiele für Sterol-Acyltransferasen und Sterol-Acyltransferase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rücküber-  
20 setzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 32 oder 50 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Sterol-Acyltransferase und Sterol-Acyltransferase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend  
25 von der Sequenz SEQ. ID. No. 31 oder 49 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

30 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Sterol-Acyltransferase SAT1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. NO. 32) oder SAT2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. NO. 50).

35

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

40 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

45

Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 31 oder 49 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 31 stellt die genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YNR019W) dar, die die Sterol-Acyltransferase SAT1 der Sequenz SEQ ID NO. 32 codiert.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 49 stellt die genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YCR048W) dar, die die Sterol-Acyltransferase SAT2 der Sequenz SEQ ID NO. 50 codiert.

Alle vorstehend erwähnten Sterol-Acyltransferase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30

Unter Organismen werden erfindungsgemäß beispielsweise Bakterien, insbesondere Bakterien der Gattung *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus spec.* oder *Streptomyces spec.*,

35 beispielsweise Hefen, insbesondere Hefen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* oder *Kluyveromyces spec.*

beispielsweise Pilze, insbesondere Pilze der Gattung *Aspergillus spec.*, *Penicillium spec.* oder *Dictyostelium spec.*

40

sowie beispielsweise auch Insektenzelllinien verstanden, die in der Lage sind, als Wildtyp oder durch vorherige genetische Veränderung Zymosterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten herzustellen.

45



Besonders bevorzugte Organismen sind Hefen, insbesondere der Spezies *Saccharomyces cerevisiae*, insbesondere die Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* AH22, *Saccharomyces cerevisiae* GRF, *Saccharomyces cerevisiae* DBY747 und *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.

5

Bei Hefen als Organismen oder genetisch veränderten Organismen können zur Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, wie vortehend erwähnt, die entspre-

10 chenden Nukleinsäuren überexprimiert werden.

Die Überexpression kann sowohl homolog durch Einbringen von hefeeigenen Nukleinsäuren als auch heterolog durch Einbringen von Nukleinsäuren aus anderen Organismen, insbesondere Säugern, oder

15 davon abgeleitete natürliche oder künstliche Varianten in die Hefe erfolgen. Vorzugsweise werden in Hefen Säugergene verwendet, da diese eine bessere Substratspezifität in Richtung 7-Dehydrocholesterol aufweisen.

20 Die Bestimmung der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität,  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, C24-Methyltransferase-Aktivität,  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität, Squalensynthetase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität des  
25 erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismus sowie des Referenzorganismus erfolgt unter folgenden Bedingungen:

Die Bestimmung der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase erfolgt wie in Th. Polakowski, Molekularbiologische Beeinflussung des Ergosterolstoffwechsels der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Shaker-Verlag, Aachen 1999, ISBN 3-8265-6211-9, beschrieben.

30

Demgemäß werden  $10^9$  Hefe-Zellen einer 48 h alten Kultur durch Zentrifugation (3500xg, 5 min) geerntet und in 2 ml Puffer I (100  
35 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH7,0) gewaschen. Das Zellpellet wird in 500  $\mu$ l Puffer 1 (cytosolische Proteine) oder 2 (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH7,0; 1% Triton X-100) (Gesamtproteine) aufgenommen, und es wird 1  $\mu$ l 500 mM PMSF in Isopropanol zugegeben. Zu den Zellen kommen 500  $\mu$ l Glasperlen ( $d = 0,5$  mm), und die Zel-  
40 len werden durch 5x eine Minute Vortexen aufgeschlossen. Die Flüssigkeit zwischen den Glasperlen wird in ein neues Eppi überführt. Zellreste bzw. Membranbestandteile werden durch 15 min Zentrifugieren (14000xg) abgetrennt. Der Überstand wird in ein neues Eppi überführt und stellt die Proteinfraktion dar.

45

Die Aktivität der HMG-CoA Aktivität wird durch Messung des Verbrauchs von NADPH+H<sup>+</sup> bei der Reduktion von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, das als Substrat zugesetzt wird, bestimmt.

- 5 In einem Testansatz von 1000 µl werden 20 µl Hefeproteinisolat mit 910 µl Puffer I; 50 µl 0,1 M DTT und 10 µl 16 mM NADPH+H<sup>+</sup> gegeben. Der Ansatz ist auf 30°C temperiert und wird für 7,5 min bei 340 nm im Photometer gemessen. Die Abnahme an NADPH, die in diesem Zeitraum gemessen wird, ist die Abbaurate ohne Substratzugabe und  
10 wird als Hintergrund berücksichtigt.

Danach erfolgt die Zugabe von Substrat (10 µl 30 mM HMG-CoA), und es werden weitere 7,5 min gemessen. Die Berechnung der HMG-CoA-Reduktase Aktivität erfolgt durch die Bestimmung der spezifischen  
15 NADPH-Abbaurate.

- Die Bestimmung der Aktivität der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität erfolgt wie in Omura, T and Sato, R. (1964) The carbon monoxide binding pigment in liver microsomes. J.Biol.Chem. 239,  
20 2370-2378, beschrieben. Bei diesem Test ist die Menge an P450-Enzym als Holoenzym mit gebundenem Häm semi-quantifizierbar. Das (aktive) Holoenzym (mit Häm) kann durch CO reduziert werden und nur das CO-reduzierte Enzym weist ein Absorptionsmaximum bei 450 nm auf. So ist das Absorptionsmaximum bei 450 nm ein Maß für  
25 die Aktivität der Lanosterol-C14-Demethylase.

- Zur Durchführung der Aktivitätsbestimmung wird eine Microsomen-Fraktion (4-10 mg/ml Protein in 100 mM Kaliumphosphat Puffer) 1:4 verdünnt, so dass die für den Test eingesetzte Protein Konzentration 2 mg/ml beträgt. Der Test wird direkt in einer Küvette durchgeführt.  
30

- Zu den Microsomen wird eine Spatelspitze Dithionite (S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>) zugeben. Mit einem Spektralphotometer wird die Baselinie aufgenommen im Bereich von 380-500 nm.  
35

- Anschliessend werden ca. 20-30 Blasen von CO durch die Probe gesprudelt. Die Absorption wird nun im selben Bereich gemessen. Die Höhe der Absorption bei 450 nm entspricht dem Anteil an P450  
40 Enzym im Testansatz.

- Die Bestimmung der Aktivität der Squalen Epoxidase erfolgt wie in Leber R, Landl K, Zinser E, Ahorn H, Spok A, Kohlwein SD, Turnowsky F, Daum G. (1998) Dual localization of squalene epoxidase,  
45 Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic

reticulum and lipid particles, Mol. Biol. Cell. 1998, Feb;9(2):375-86, beschrieben.

Diese Methode enthält 0,35 bis 0,7 mg microsomales Protein oder  
5 3,5 bis 75 µg Lipidpartikel Protein in 100mM Tris-HCl, pH 7,5,  
1 mM EDTA, 0,1 mM FAD, 3 mM NADPH, 0,1 mM squalene 2,3-epoxidase  
cyclase inhibitor U18666A, 32 µM [<sup>3</sup>H]Squalen dispergiert in 0,005%  
Tween 80 in einem Gesamtvolumen von 500 µl.

10 Der Test wird bei 30°C durchgeführt. Nach einer Vorbehandlung für  
10 min, wird die Reaktion durch Zugabe von Squalen gestartet und  
nach 15, 30 oder 45 min durch Lipid Extraktion mit 3 ml Chloro-  
form/Methanol (2:1 vol/vol) und 750 µl 0,035 % MgCl<sub>2</sub> beendet.

15 Die Lipide werden unter Stickstoff getrocknet und in 0,5 ml Chlo-  
roform/Methanol (2:1 vol/vol) rückgelöst. Für eine Dünnschicht  
Chromatographie werden Teile auf eine Silica Gel 60 Platte (0,2  
mm) gegeben und mit Chloroform als Laufmittel aufgetrennt. Die  
Positionen, die [<sup>3</sup>H]2,3-oxidosqualen und [<sup>3</sup>H]Squalene enthalten  
20 wurden ausgekratzt und mit einem Szintillationzähler quantifi-  
ziert.

Die Bestimmung der Aktivität der Δ<sup>8</sup>-Δ<sup>7</sup>-Isomerase erfolgt in  
leichter Abwandlung wie in Silve S. et al.: Emopamil-binding Pro-  
25 tein, a Mammalian Protein That Binds a Series of Structurally  
Diverse Neuroprotective Agents, Exhibits 8-7 Sterol Isomerase Ac-  
tivity in Yeast. J Biol Chem 1996 Sep 13;271(37):22434-40 be-  
schrieben:

30 Aus 10 ml Kulturvolumen aufgearbeitete Microsomen werden für 3 h  
in der Anwesenheit von 75 µM Cholesta-8-en-3-ol bei 30 °C inku-  
biert. Die Sterole werden anschliessend mit 4 mal 5 ml Hexan ex-  
trahiert und aufgereinigt. Aliquots werden mittels GC/MS analy-  
siert

35 Die Bestimmung der Aktivität der Δ<sup>5</sup>-Desaturase erfolgt in leicht-  
ter Abwandlung wie in Nishi, S. et al. (2000): cDNA cloning of the  
mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mu-  
tant. Biochim. Biophys. Acta 1490(1-2), 106-108, beschrieben:

40 Aus 10 ml Kulturvolumen aufgearbeitete Microsomen werden für 3 h  
in der Anwesenheit von 75 µM Lathosterol und 2 mM NADH bei 30 °C  
inkubiert. Die Sterole werden anschliessend mit 4 mal 5 ml Hexan  
extrahiert und aufgereinigt. Aliquots werden mittels GC/MS analy-  
45 siert

Die Bestimmung der Aktivität der  $\Delta 24$ -Reduktase kann wie im folgenden beschrieben durchgeführt werden:

Aus 10 ml Kulturvolumen aufgearbeitete Microsomen werden für 3 h  
5 in der Anwesenheit von 75  $\mu\text{M}$  Cholesta-5,7,24-trienol bei 30 °C inkubiert. Sterole werden anschliessend mit 4 mal 5 ml Hexan extrahiert und aufgereinigt. Aliquots werden mittels GC/MS analysiert.

Die Bestimmung der Aktivität der C24-Methyltransferase kann wie  
10 im folgenden beschrieben durchgeführt werden:

Das Protein Erg6p (C24-Methyltransferase) ist zu 80% in Lipidpartikel in der Hefe nachweisbar (Athenstaedt K, Zweytick D, Jandrositz A, Kohlwein SD, Daum G: Identification and characterization  
15 of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 1999 Oct;181(20):6441-8). Zur Bestimmung der Enzymaktivität werden Lipidpartikel aus einem Kulturvolumen (48h) von 100 ml aufgearbeitet (nach einer Methode beschrieben bei Athenstaedt K, Zweytick D, Jandrositz A, Kohlwein SD, Daum G:  
20 Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 1999 Oct;181(20):6441-8).

Der Proteingehalt wird durch einen Biorad Enzymtest) bestimmt und  
25 für jeden Testansatz werden 3 mg Protein eingesetzt in einem Volumen von 500  $\mu\text{l}$ . Dem Testansatz werden 50  $\mu\text{M}$  [methyl- $^3\text{H}$ ]-S-Adenosyl-Methionin und 50  $\mu\text{M}$  Zymosterol zugesetzt und der Ansatz wird 10 min bei 35°C inkubiert. Anschliessend wird das gleiche Volumen (500  $\mu\text{l}$ ) Chloroform/Methanol (4:1) zugesetzt und anschlie-  
30 ßend die Sterole extrahiert.

Mittels Szintillationsmessung kann der Anteil an Zymosterol mit eingebautem [methyl- $^3\text{H}$ ]-S-Adenosyl-Methionin bestimmt werden, da durch die Chloroform/Methanol Extraktion nur lipidlösliche Sub-  
35 stanzen extrahiert werden. Zur Quantifizierung werden die radioaktiven Zerfälle ebenfalls für 50  $\mu\text{M}$  [methyl- $^3\text{H}$ ]-S-Adenosyl-Methionin mittels Szintillationsmessung bestimmt.

Dieses Verfahren ist eine Abwandlung des in Nes WD, Guo D, Zhou  
40 W.: Substrate-based inhibitors of the (S)-adenosyl-L-methionine: $\Delta 24(25)$ - to  $\Delta 24(28)$ -sterol methyl transferase from *Saccharomyces cerevisiae*, Arch. Biochem. Biophys. 1997 Jun 1;342(1):68-81. beschriebenen Verfahrens.

45 Die Bestimmung der Aktivität der  $\Delta 22$ -Desaturase (ERG5p) kann wie im folgenden beschrieben durchgeführt werden:

Verschiedene Konzentrationen von Ergosta-5,7-dienol, aufgereinigt aus *erg5* Mutantnen von *S. cerevisiae* (Parks et al, 1985. Yeast sterols.yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. Methods Enzymol. 111:333-346) und 50 µg dilauroylphosphatidylcholin werden gemischt und mit Ultraschall behandelt, bis eine weisse Suspension entsteht. Aufgearbeitete Mikrosomen werden hinzugegeben (1 ml) (3 mg/ml Protein). NADPH (Endkonzentration, 1 mM) wird dem Testansatz zum Start der Enzymreaktion hinzugegeben. Der Ansatz wird 20 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 ml Methanol gestoppt und Sterole werden verseift durch Zugabe von 2 ml 60% (wt/vol) KOH in Wasser. Der Ansatz wird bei 90°C for 2 h inkubiert. Der Ansatz wird nach dem Abkühlen dreimal mit 5 ml Hexan extrahiert und durch Rotationsverdampfung eingeengt. Anschliessend werden die Sterole 1h bei 60°C mit *bis*(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid (50 µl in 50 µl Toluol) silyliert. Die Sterole werden durch Gas Chromatographie-Massen Spektroskopie (GC-MS) ( beispielsweise Model VG 12-250 gas chromatograph-mass spectrometer; VG Biotech, Manchester, United Kingdom) analysiert. Das entstandene Δ<sup>22</sup>-desaturierte Intermediat kann abhängig von der eingesetzten Menge an Substrat identifiziert werden. Als Referenz dienen Mikrosomen, die nicht mit Substrat inkubiert werden.

Dieses Verfahren ist eine Abwandlung des in Lamb et al: Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 sterol delta<sup>22</sup>-desaturase from the pathogenic fungus *Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jul;43(7):1725-8., beschriebenen Verfahrens.

Die Bestimmung der Aktivität der Squalensynthetase kann wie im folgenden beschrieben durchgeführt werden:

Die Tests enthalten 50 mM Mops, pH 7.2, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Tween-80, 10% (v/v) 2-propanol, 1 mM DTT, 1 mg/mL BSA, NADPH, FPP (or PSPP) und Mikrosomen (3mg Proteingehalt) in einem Gesamtvolumen von 200 µl in Glassröhrchen. Reaktionen mit radioaktivem Substrat [1-<sup>3</sup>H]FPP (15-30 mCi/µmol) werden bei 30 °C für 30 min inkubiert und der Suspensionsansatz mit einem Volumen von 1:1 (v/v) 40% wässriges KOH:Methanol aufgefüllt. Flüssiges NaCl wird zur Sättigung der Lösung hinzugegeben und 2 ml Ligroin enthaltend 0.5% (v/v) Squalen werden ebenfalls zugefügt.

Die Suspension wurde für 30 s gevortext. Je 1 ml der Ligroin Schicht wird in einer Pasteur Pipette auf eine gepackte 0.5 x 6 cm Aluminium Säule (80-200 mesh, Fisher) gegeben. Die Säule ist mit 2 ml Ligroin mit 0.5% (v/v) Squalen präequilibriert. Anschliessend wird die Säule mit 5 x 1 ml Toluol enthaltend 0.5% (v/v) Squalen

eluiert. Die Radioaktivität von Squalen wird in Cytoscint (ICN) Szintillations Cocktail mit einem Szintillationszähler (Beckman) gemessen.

- 5 Dieses Verfahren ist eine Abwandlung der in Radisky et al., *Biochemistry*. 2000 Feb 22;39(7):1748-60, Zhang et al. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 133-143 und Poulter, C. D. et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 3734-3739, beschriebenen Verfahren.
- 10 Die Bestimmung der Aktivität der Sterol-Acyltransferase kann wie im folgenden beschrieben durchgeführt werden:
- Aus einer 20 ml Vorkultur, die zwei Tage inkubiert wird, wird eine 200 ml Hauptkultur 1%ig angeimpft und über Nacht in Voll-
- 15 medium bebrütet. Die Zellen werden geerntet und anschliessend in doppeltem Volumen HP-Puffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 0,5 mM EDTA; 1 mM Glutathion; 20 µM Leupeptin; 64 µM Benzamidin; 2 mM PMSF) gewaschen und in HP Puffer resuspendiert.
- 20 Nach Zugabe von 1 g Glasperlen werden die Zellen 8 mal eine Minute durch vortexen aufgeschlossen. Der Überstand wird bei 105000 xg ultrazentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml ACAT-Puffer (100 mM Kalium-Phosphatpuffer pH7,4; 1 mM Glutathion) aufgenommen.
- 25 Der Enzymtest erfolgt in einem Volumen von 500 µl. Das Substrat Ergosterol wird in 62,5 ml 0,5 x ACAT-Puffer aufgenommen unter heftigem Vortexen. 250 µl dieser Lösung werden als Substrat für den Test eingesetzt. Dazu kommen 20 µl Proteinextrakt, 50 µl Wasser und 130 µl 0,5 x ACAT-Puffer.
- 30 Der Ansatz wird für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach werden 50 µl 14C-Oleoyl-CoA (600000 dpm) zugegeben und die Reaktion wird nach einer Minute durch Zugabe von 4 ml Chloroform/Methanol (2:1) gestoppt. Dazu kommen 500 µl H<sub>2</sub>O. Zur Phasentrennung wird die Suspension kurz bei 2000 xg zentrifugiert. Die untere Phase wird in
- 35 einem Spitzkolben bis zur Trockne eingengt und in 100 µl Chloroform/Methanol (4:1) rückgelöst und auf eine DC-Platte (Kieselgel 60 F254) aufgetragen. Die DC wird mit Petroether/Diethylether/Essigsäure 90:10:1 als Laufmittel durchgeführt. Die Flecken der
- 40 Sterylesterfraktion werden ausgeschnitten und in einem Szintillationszähler die Anzahl der radioaktiven Zerfälle bestimmt. Über die Menge der in Sterylester gebundene 14C-Oleoyl-CoA Moleküle ist die Enzymaktivität bestimmbar.
- 45 In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch

Kultivierung von Organismen, insbesondere von Hefen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen, zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe C24-Methyltransferase-Aktivität und  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen und zusätzlich eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität aufweisen.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Organismen, insbesondere von Hefen, die gegenüber dem Wildtyp

- eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität aufweisen,
- 20 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,
- 25 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,
- 30 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,
- 35 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 40 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

## 45

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 5 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 10

- eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 15

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 20 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

25

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 30 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,
- 35

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

40

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

45



## 46

eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 5 eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 10 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine  
15 reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

20

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

25

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,  
30

eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,

- 35 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,  
40

- eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,  
45

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,

- 5 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 10 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 15 eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 20 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 25 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 30 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 35 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 40 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 45 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

## 48

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 5 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 10 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 15 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 20 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 25 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 30 eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 35 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 40 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 45 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-

Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität und eine erhöhte Lanosterol-  
5 rol-C14-Demethylase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,  
15

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,  
20

eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,

25 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,  
30

eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,  
35

eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

40 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,  
45

eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

5 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-

15 C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Ak-

20 tivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

25

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

30 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desatu-

35 rase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desa-

40 turase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desatu-

45 rase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

5 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

15 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

20 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

25 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,

30 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-  
35 C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Akti-  
40 vität und eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,

45

eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,

- 5 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,
- 10 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 15 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 20 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 25 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 30 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 35 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 40 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 45 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 5 eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 10 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 15 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 20 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 25 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- 30 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 35 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 40 eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

- 45 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-



C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

15 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und  
20 eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und  
25 eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen oder  
30

35 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität und eine reduzierte  
40 C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.

In weiteren besonders bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder  
45 Folgeprodukten durch Kultivierung von Organismen, insbesondere von Hefen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine er-

höhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität aufweisen,

5

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Akti-

10 vität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine redu-

15

zierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

20 eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität, eine erhöhte Squalen-

25

synthetase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine redu-

30

zierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität, eine erhöhte Sterol-Acyltransferase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.

35

eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte  $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität,

40 eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität, eine erhöhte Squalensynthetase-Aktivität, eine erhöhte Sterol-Acyltransferase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.

45 Unter den biosynthetischen Zwischenprodukten des 7-Dehydrocholesterol, werden alle Verbindungen verstanden, die im verwendeten Organismus bei der Biosynthese von 7-Dehydrocholesterol als Zwi-

schenprodukte auftreten, vorzugsweise die Verbindungen Mevalonat, Farnesylpyrophosphat, Geraniolpyrophosphat, Squalenepoxid, 4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol, 4,4 Dimethylzymosterol, Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, Lathosterol, Cholesta-7,24-dienol und Cholesta-5,7,24-trienol.

Unter den biosynthetischen Folgeprodukten des Zymosterols, werden alle Verbindungen verstanden, die sich im verwendeten Organismus biosynthetisch von 7-Dehydrocholesterol ableiten, daß heißt bei denen 7-Dehydrocholesterol als Zwischenprodukt auftritt. Dies können Verbindungen sein, die der verwendete Organismus natürlicherweise aus 7-Dehydrocholesterol herstellt, wie beispielsweise Cholesterol oder Vitamin D<sub>3</sub> in Säugern. Es werden aber auch Verbindungen verstanden, die erst durch Einbringen von Genen und Enzymaktivitäten aus anderen Organismen, zu denen der Ausgangsorganismus kein orthologes Gen aufweist, im Organismus aus 7-Dehydrocholesterol hergestellt werden können.

Beispielsweise können durch Einbringen von Säugergenen in Hefe, Folgeprodukte aus 7-Dehydrocholesterol hergestellt werden, die natürlich nur in Säugern vorkommen:

Durch Einbringen einer humanen oder murinen Nukleinsäure, kodierend eine humane oder murine  $\Delta$ -7-Reduktase wird die Hefe in die Lage versetzt Cholesterol zu produzieren.

Unter UV-Bestrahlung entsteht aus 7-Dehydrocholesterol über Provitamin D<sub>3</sub> unter Umlagerung Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol).

Unter den biosynthetischen Folgeprodukten des 7-Dehydrocholesteroles werden daher insbesondere Provitamin D<sub>3</sub>, Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) und/oder Cholesterol verstanden.

Bevorzugte biosynthetische Folgeprodukte sind Provitamin D<sub>3</sub> und insbesondere Vitamin D<sub>3</sub>.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen können in Biotransformationen, chemischen Reaktionen und zu therapeutischen Zwecken verwendet werden, beispielsweise zur Gewinnung von Vitamin D<sub>3</sub> aus 7-Dehydrocholesterol über UV-Bestrahlung, oder zur Gewinnung von Steroidhormonen über Biotransformation ausgehend von Cholesta-7,24-dienol oder Cholesta-5,7,24-trienol.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen, im folgenden auch transgene Orga-

nismen bezeichnet, ein Ernten der Organismen und ein Isolieren von 7-Dehydrocholesterol und/ oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus den Organismen angeschlossen.

- 5 Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie Bakterien, Moose, Hefen und Pilze oder Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren  
10 abgetrennt werden.

- Die Isolierung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus der geernteten Biomasse erfolgt gemeinsam oder jede Verbindung für sich in an  
15 sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

20

- Die Herstellung der transgenen Organismen, insbesondere Hefen kann vorzugsweise durch Transformation der Ausgangsorganismen, insbesondere Hefen, entweder mit einem Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der  
25 Gruppe Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase und Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, erfolgen. Die Herstellung der trans-  
30 genen Organismen erfolgt in dieser Ausführungsform mit einem Nukleinsäurekonstrukt.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das vorstehend beschriebene Nukleinsäurekonstrukt zusätzlich mindestens  
35 eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die mit  
40 einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

- Die Herstellung der transgenen Organismen kann aber auch vorzugs-  
45 weise durch Transformation der Ausgangsorganismen, insbesondere Hefen, mit mindestens einem Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codie-

rend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase und Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase und diese jeweils mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, erfolgen. Die Herstellung der transgenen Organismen erfolgt in dieser Ausführungsform mit einzelnen Nukleinsäurekonstrukten oder einer Kombination von Nukleinsäurekonstrukten.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die vorstehend beschriebene Kombination von Nukleinsäurekonstrukten zusätzlich mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die jeweils mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

25 Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Hefen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

30

Nukleinsäurekonstrukte enthaltend diese Expressionskassette sind beispielsweise Vektoren oder Plasmide.

Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere als Expressionskassette fungierende Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase und Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Nukleinsäurekonstrukt zusätzlich mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren co-

dierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationsignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

5

Alternativ können die erfindungsgemäßen transgenen Organismen auch durch Transformation mit einzelnen Nukleinsäurekonstrukten oder einer Kombination aus Nukleinsäurekonstrukten hergestellt werden, wobei die Kombination

10

mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe A bis C

15        A    Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

20        B    Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten und

25

      C    Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

30

und mindestens ein Nukleinsäurekonstrukte, ausgewählt aus der Gruppe D bis H

35        D    Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

40

      E    Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

45

- 5 F Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 10 G Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 15 H Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten
- umfasst.

- 20 Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Hefen gewährleisten.

- Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also
- 25 regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende einen Terminator und gegebenenfalls
- 30 falls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind.

- Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle
- 35 Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, gegebenenfalls Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

- 40 Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Plasmide für Hefen und Pilze und Verfahren zur Herstellung von transgenen Hefen, sowie die transgenen Hefen selbst beschrieben.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Organismen, insbesondere in Hefen steuern kann.

- 5 Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen Promotor, der in der Hefe einer reduzierten Regulation unterliegt, wie beispielsweise der mittlere ADH-Promotor.

- Dieses Promotorfragment des ADH12s Promotors, im folgenden auch  
10 ADH1 bezeichnet, zeigt eine annähernd konstitutive Expression (Ruohonen L, Penttilä M, Keränen S. (1991) Optimization of *Bacillus* alpha-amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. May-Jun;7(4):337-462; Lang C, Looman AC. (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. Dec;44(1-2):147-56.), so daß die transkriptionelle Regulation nicht mehr über Intermediate der Ergosterolbiosynthese abläuft.

- Weitere bevorzugte Promotoren mit reduzierter Regulation sind  
20 konstitutive Promotoren wie beispielsweise der TEF1-Promotor aus Hefe, der GPD-Promotor aus Hefe oder der PGK-Promotor aus Hefe (Mumberg D, Müller R, Funk M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene. 1995 Apr 14;156(1):119-22; Chen CY, Oppermann  
25 H, Hitzeman RA. (1984) Homologous versus heterologous gene expression in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. Dec 11;12(23):8951-70.).

- Die Expressionskassette kann auch induzierbare Promotoren, insbesondere chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression der Nukleinsäuren kodierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase,  $\Delta 5$ -Desaturase,  $\Delta 24$ -Reduktase, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase im Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann.  
35

- Derartige Promotoren wie beispielsweise der CupI-Promotor aus Hefe (Etcheverry T. (1990) Induced expression using yeast copper metallothionein promoter. Methods Enzymol. 1990;185:319-29.), der  
40 Gall1-10-Promotor aus Hefe (Ronicke V, Graulich W, Mumberg D, Müller R, Funk M. (1997) Use of conditional promoters for expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, Methods Enzymol. 283:313-22) oder der Pho5-Promotor aus Hefe (Bajwa W, Rudolph H, Hinnen A. (1987) PHO5 upstream sequences confer phosphate control on the constitutive PHO3 gene. Yeast. 1987 Mar;3(1):33-42) können beispielsweise benutzt werden.  
45



Als Terminator der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Terminator geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Organismen, insbesondere in Hefen steuern kann.

- 5 Bevorzugt ist der Tryptophan-Terminator aus Hefe (TRP1-Terminator).

- Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit den vorstehend be-
- 10 schriebenen Nukleinsäuren kodierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase,  $\Delta 5$ -Desaturase,  $\Delta 24$ -Reduktase, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase und gegebenenfalls einem Terminator nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in
- 15 T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M.
- 20 et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

- Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus syn-
- 25 thetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

- Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Hefen bevorzugt werden. Diese
- 30 von Hefen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Hefespezies exprimiert werden.

- Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die
- 35 Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente
- 40 Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

- Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Inser-
- 45 tion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb

der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zum Wirtsorganismus sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

- 10 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktions-schnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, 15 "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung 20 gestellt werden.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder der vorstehend beschriebenen Proteine zur Herstellung von transgenen Organismen, insbesondere Hefen. 25

Vorzugsweise weisen diese transgenen Organismen, insbesondere Hefen gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an 7-Dehydro- 30 cholesterol und /oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten auf.

Daher betrifft die Erfindung ferner die Verwendung der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren oder der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte zur Erhöhung des Gehalts an 7-Dehydrocholesterol 35 und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten in Organismen.

Die vorstehend beschriebenen Proteine und Nukleinsäuren können 40 zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten in transgenen Organismen verwendet werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom eines Organismus, 45 insbesondere von Hefe wird als Transformation bezeichnet.

Dazu können insbesondere bei Hefen an sich bekannte Methoden zur Transformation genutzt werden.

- Geeignete Methoden zur Transformation von Hefen sind beispielsweise die LiAC-Methode, wie in Schiestl RH, Gietz RD. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier, Curr Genet. Dec;16 (5-6):339-46, beschrieben, die Elektroporation wie in Manivasakam P, Schiestl RH. (1993) High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. Nucleic Acids Res. Sep 11;21(18):4414-5, beschrieben oder die Protoplasierung, wie in Morgan AJ. (1983) Yeast strain improvement by protoplast fusion and transformation, Experientia Suppl. 46:155-66 beschrieben.
- Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor, insbesondere in Plasmide kloniert, die geeignet sind, Hefen zu transformieren, wie beispielsweise die Vektorsysteme Yep24 (Nau-movski L, Friedberg EC (1982) Molecular cloning of eucaryotic genes required for excision repair of UV-irradiated DNA: isolation and partial characterization of the RAD3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol Oct;152(1):323-31), Yep13 (Broach JR, Strathern JN, Hicks JB. (1979) Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene. Gene. 1979 Dec;8(1):121-33), die pRS-Serie von Vektoren (Centromer und Episomal) (Sikorski RS, Hieter P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. May;122(1):19-27) sowie die Vektorsysteme YCp19 oder pYEXBX.
- Dementsprechend betrifft die Erfindung weiterhin Vektoren, insbesondere Plasmide enthaltend die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen, indem man eine vorstehend beschriebene Nukleinsäure oder ein vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt in den Ausgangsorganismus funktionell einführt.

Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Organismen, wobei die genetische Veränderung mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp erhöht.

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase und Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase.

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung der Genexpression der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren durch Erhöhung der Kopienzahl der Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase und/oder codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase im Organismus.

Dementsprechend betrifft die Erfindung bevorzugt einen vorstehend beschriebenen genetisch veränderten Organismus der zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase enthält.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen genetischen Veränderungen eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe C24-Methyltransferase-Aktivität und Delta22-Desaturase-Aktivität auf.

Die Reduzierung mindestens einer der Aktivitäten wird vorzugsweise durch eine Reduzierung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine C24-Methyltransferase und Nukleinsäuren codierend eine Delta22-Desaturase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt.

Ein besonders bevorzugter genetisch veränderter Organismus weist zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen genetischen Veränderungen kein funktionelles C24-Methyltransferase-Gen und/oder Delta22-Desaturase-Gen auf.

Besonders bevorzugt sind vorstehend erwähnte, genetisch veränderte Organismen bei denen die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität, Squalensynthetase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität, gegenüber einem Wildtyp erhöht.

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung mindestens einer dieser Aktivitäten, wie vorstehend erwähnt, durch eine Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe

Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, gegenüber dem Wildtyp.

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase gegenüber dem Wildtyp durch Erhöhung der Kopienzahl mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase im Organismus.

Dementsprechend betrifft die Erfindung bevorzugt einen vorstehend beschriebenen genetisch veränderten Organismus der zwei oder mehr Nukleinsäuren mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase enthält.

Insbesondere betrifft die Erfindung bevorzugt einen genetisch veränderten Organismus, der zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen genetischen Veränderungen zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase enthält.

Die vorstehend beschriebenen genetisch veränderten Organismen weisen gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten auf.

Dementsprechend betrifft die Erfindung einen vorstehend beschriebenen genetisch veränderten Organismus, dadurch gekennzeichnet, daß der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp ei-

nen erhöhten Gehalt an 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aufweist.

Bevorzugte, genetisch veränderte Organismen sind erfindungsgemäß  
5 genetisch veränderte Hefen oder Pilze, insbesondere erfindungsgemäß genetisch veränderte Hefen, insbesondere die erfindungsgemäß genetisch veränderte Hefespezies *Saccharomyces cerevisiae*, insbesondere die genetisch veränderten Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* AH22, *Saccharomyces cerevisiae* GRF, *Saccharomyces*  
10 *cerevisiae* DBY747 und *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.

Erhöhung des Gehaltes an 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen und/oder Folgeprodukten bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise die künstlich er-  
15 worbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung mindestens einer dieser, vorstehend erwähnten Verbindungen in dem genetisch veränderten Organismus gegenüber dem nicht genetisch veränderten Organismus.

20 Unter Wildtyp wird dementsprechend, wie eingangs erwähnt, vorzugsweise der genetisch nicht veränderte Organismus, insbesondere aber der vorstehend erwähnte Referenzorganismus verstanden.

Unter einem erhöhten Gehalt an 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen und/oder Folgeprodukten im Vergleich zum Wildtyp wird insbesondere die Erhöhung des Gehaltes  
25 mindestens einer der vorstehend erwähnten Verbindungen im Organismus um mindestens 50%, vorzugsweise 100%, bevorzugter 200%, besonders bevorzugt 400% im Vergleich zum Wildtyp verstanden.

30 Die Bestimmung des Gehalts an mindestens einer der erwähnten Verbindungen erfolgt vorzugsweise nach an sich bekannten analytischen Methoden und bezieht sich vorzugsweise auf die Kompartimente des Organismus in denen Sterole produziert werden.

35 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

#### I. Allgemeine experimentelle Bedingungen

40

##### 1. Restriktion

Die Restriktion der Plasmide (1 bis 10 µg) wurde in 30 µl Ansätzen durchgeführt. Dazu wurde die DNA in 24 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 3 µl des entsprechenden Puffers, 1 ml RSA (Rinderserumalbumin) und  
45 2 µl Enzym versetzt. Die Enzymkonzentration betrug 1 Unit/µl oder 5 Units/µl je nach DNA Menge. In einigen Fällen wurde dem Ansatz noch 1 µl RNase zugegeben, um die tRNA abzubauen. Der Restrik-

tionsansatz wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Kontrolliert wurde die Restriktion mit einem Minigel.

## 2. Gelelektrophoresen

- 5 Die Gelelektrophoresen wurden in Minigel- oder Wide-Minigelapparaturen durchgeführt. Die Minigele (ca. 20 ml, 8 Taschen) und die Wide-Minigele (50 ml, 15 oder 30 Taschen) bestanden aus 1%iger Agarose in TAE. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die Proben (10 µl) wurden mit 3 µl Stopperlösung versetzt und aufgetragen. Als Standard diente I-DNA geschnitten mit *HindIII* (Banden bei: 23,1 kb; 9,4 kb; 6,6 kb; 4,4 kb; 2,3 kb; 2,0 kb; 0,6 kb). Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 80 V für 45 bis 60 min angelegt. Danach wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung angefärbt und unter UV-Licht mit dem Video-Dokumentationssystem INTAS festgehalten oder mit einem Orange-Filter fotografiert.

## 3. Gelelution

- Mittels Gelelution wurden die gewünschten Fragmente isoliert. Der Restriktionsansatz wurde auf mehrere Taschen eines Minigels aufgetragen und aufgetrennt. Nur  $\lambda$ -*HindIII* und eine "Opferspur" wurden in Ethidiumbromidlösung angefärbt, unter UV-Licht betrachtet und das gewünschte Fragment markiert. Dadurch wurde verhindert, daß die DNA der restlichen Taschen durch das Ethidiumbromid und das UV-Licht geschädigt wird. Durch Aneinanderlegen des gefärbten und ungefärbten Gelstücks konnte anhand der Markierung das gewünschte Fragment aus dem ungefärbten Gelstück herausgeschnitten werden. Das Agarosestück mit dem zu isolierenden Fragment wurde in einen Dialyseschlauch gegeben, mit wenig TAE-Puffer luftblasenfrei verschlossen und in die BioRad-Minigelapparatur gelegt.
- 30 Der Laufpuffer bestand aus 1 x TAE und die Spannung betrug 100 V für 40 min. Danach wurde für 2 min die Strompolarität gewechselt, um am Dialyseschlauch klebende DNA wieder zu lösen. Der die DNA-Fragmente enthaltende Puffer des Dialyseschlauches wurde in Reaktionsgefäße überführt und damit eine Ethanol Fallung durchgeführt. Dazu wurde der DNA-Lösung 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat, tRNA (1 µl pro 50 µl Lösung) und dem 2,5 fachen Volumen an eiskaltem 96%igem Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei -20°C inkubiert und dann bei 12000 rpm, 30 min, 4°C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 10 bis 50 µl H<sub>2</sub>O (je nach DNA-Menge) aufgenommen.

## 4. Klenow-Behandlung

- Durch die Klenow-Behandlung werden überstehende Enden von DNA Fragmenten aufgefüllt, so daß "blunt-ends" entstehen. Pro 1 µg DNA wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

	DNA-Pellet + 11 µl	H <sub>2</sub> O
	+ 1,5 µl	10 x Klenow Puffer
	+ 1 µl	0,1 M DTT
	+ 1 µl	Nucleotide (dNTP 2 mM)
5 25	+ 1 µl	Klenow-Polymerase (1 Unit/µl)

Die DNA sollte dabei aus einer Ethanolfällung stammen, um zu verhindern, daß Verunreinigungen die Klenow-Polymerase hemmen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C, durch weitere 5 min bei 10 70 °C wurde die Reaktion abgestoppt. Die DNA wurde aus dem Ansatz durch eine Ethanolfällung gewonnen und in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 5. Ligation

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden vereinigt. Das Endvolumen 15 von 13,1 µl enthielt ca. 0,5 µl DNA mit einem Vektor-Insert Verhältnis von 1:5. Die Probe wurde 45 Sekunden bei 70 °C inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt (ca. 3 min) und dann 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ligationspuffer zugegeben: 2,6 µl 500 mM TrisHCl pH 7,5 und 1,3 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub> und weitere 10 min 20 auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl 500 mM DTT und 1 µl 10 mM ATP und nochmaligen 10 min auf Eis wurde 1 µl Ligase (1 Unit/µl) zugegeben. Die ganze Behandlung sollte möglichst erschütterungsfrei erfolgen, um aneinanderliegende DNA-Enden nicht wieder zu trennen. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14 °C.

25

#### 6.E. coli-Transformation

Kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) NM522 Zellen wurden mit der DNA des Ligationsansatzes transformiert. Als Positiv-Kontrolle lief ein Ansatz mit 50 µg des pScL3 Plasmids und als Null-Kontrolle ein Ansatz ohne DNA mit. Für jeden Transformationsansatz 30 wurden 100 µl 8% PEG-Lösung, 10 µl DNA und 200 µl kompetente Zellen (*E. coli* NM522) in ein Tischzentrifugenröhrchen pipettiert. Die Ansätze wurden für 30 min in Eis gestellt und gelegentlich geschüttelt.

35

Danach erfolgte der Hitzeschock: 1 min bei 42 °C. Für die Regeneration wurde den Zellen 1 ml LB-Medium zugegeben und für 90 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Je 100 µl der unverdünnten Ansätze, einer 1:10 Verdünnung und einer 1:100 Verdünnung 40 wurden auf LB + Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

#### 7. Plasmid-Isolation aus *E. coli* (Minipräp)

*E. coli*-Kolonien wurden über Nacht in 1,5 ml LB + Ampicillin-Medium in Tischzentrifugenröhrchen bei 37 °C und 120 rpm angezo- 45 gen. Am nächsten Tag wurden die Zellen 5 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.



## 70

Jeder Ansatz wurde mit 100 µl 0,2 N NaOH, 1 % SDS-Lösung versetzt, gemischt und für 5 min auf Eis gestellt (Lyse der Zellen). Danach wurden 400 µl Na-Acetat/NaCl-Lösung (230 µl H<sub>2</sub>O, 130 µl 3 M Natriumacetat, 40 µl 5M NaCl) zugegeben, der Ansatz gemischt und für weitere 15 min auf Eis gestellt (Proteinfällung). Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 11000 rpm wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, in ein Eppendorfggefäß überführt. War der Überstand nicht vollständig klar, wurde nochmal zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 360 µl eisgekühltem Isopropanol versetzt und für 30 min bei -20 °C inkubiert (DNA-Fällung). Die DNA wurde abzentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl eisgekühltem 96%igem Ethanol gewaschen, 15 min bei -20 °C inkubiert und erneut abzentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde im Speed Vac getrocknet und dann in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Plasmid DNA wurde durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Dazu wurden 10 µl jedes Ansatzes restringiert und in einem Wide-Minigel gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe oben).

## 20 8. Plasmid-Aufarbeitung aus E. coli (Maxipräp)

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurde die Maxipräp Methode durchgeführt. Zwei Kolben mit 100 ml LB + Ampicillin-Medium wurden mit einer Kolonie bzw. mit 100 µl einer Gefrierkultur, die das zu isolierende Plasmid trägt, angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 120 rpm bebrütet. Die Anzucht (200 ml) wurde am nächsten Tag in einen GSA-Becher überführt und bei 4000 rpm (2600 x g) 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml TE-Puffer aufgenommen. Zum Abbau der Zellwand wurden 1,2 ml Lysozym-Lösung (20 mg/ml TE-Puffer) zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit 12 ml 0,2 N NaOH, 1 % SDS Lösung und weiteren 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proteine wurden durch die Zugabe von 9 ml gekühlter 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und einer 15 minütigen Inkubation auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation (GSA: 13000 rpm (27500 x g), 20 min, 4 °C) wurde der Überstand, der die DNA enthielt, in einen neuen GSA-Becher überführt und die DNA mit 15 ml eiskaltem Isopropanol und einer Inkubation von 30 min bei -20 °C gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 5 ml eisgekühltem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet (ca. 30 - 60 min). Danach wurde es in 1 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Es fand eine Überprüfung des Plasmids durch Restriktionsanalyse statt. Die Konzentration wurde durch Auftragen von Verdünnungen auf einem Minigel bestimmt. Zur Verringerung des Salzgehaltes erfolgte eine 30 - 60 minütige Mikrodialyse (Porengröße 0,025 µm).

## 9. Hefe-Transformation

Für die Hefe-Transformation wurde eine Voranzucht des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* AH22 angesetzt. Ein Kolben mit 20 ml YE-Medium wurde mit 100 µl der Gefrierkultur angeimpft und über  
5 Nacht bei 28 °C und 120 rpm bebrütet. Die Hauptanzucht erfolgte unter gleichen Bedingungen in Kolben mit 100 ml YE-Medium, die mit 10 µl, 20 µl oder 50 µl der Voranzucht angeimpft wurden.

### 9.1 Erstellen kompetenter Zellen

10 Am nächsten Tag wurden die Kolben mittels Thomakammer ausgezählt und es wurde mit dem Kolben, der eine Zellzahl von  $3 - 5 \times 10^7$  Zellen/ml besaß weitergearbeitet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (GSA: 5000 rpm (4000 x g) 10 min) geerntet. Das Zellpellet wurde in 10 ml TE-Puffer aufgenommen und auf zwei Tischzen-  
15 trifugenröhrchen aufgeteilt (je 5 ml). Die Zellen wurden 3 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und noch zweimal mit je 5 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 330 µl Lithiumacetat-Puffer pro  $10^9$  Zellen aufgenommen, in einen sterilen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und eine Stunde bei 28 °C ge-  
20 schüttelt. Dadurch waren die Zellen kompetent für die Transformation.

### 9.2 Transformation

Für jeden Transformationsansatz wurden 15 µl Heringssperma DNA  
25 (10 mg/ml), 10 µl zu transformierende DNA (ca. 0,5 µg) und 330 µl kompetente Zellen in ein Tischzentrifugenröhrchen pipettiert und 30 min bei 28 °C (ohne Schütteln) inkubiert. Danach wurden 700 µl 50% PEG 6000 zugegeben und für eine weitere Stunde bei 28 °C, ohne Schütteln, inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 5 min bei  
30 42 °C.  
100 µl der Suspension wurden auf Selektionsmedium (YNB, Difco) ausplattiert, m auf Leucinprototrophie zu selektionieren. Im Falle der Selektion auf G418 Resistenz wird nach dem Hitzeschock eine Regeneration der Zellen durchgeführt (s. unter 9.3 Regenera-  
35 tion sphase)

### 9.3 Regenerationsphase

Da der Selektionsmarker die Resistenz gegen G418 ist, brauchten die Zellen Zeit für die Expression des Resistenz-Gens. Die Trans-  
40 formationsansätze wurden mit 4 ml YE-Medium versetzt und über Nacht bei 28 °C auf dem Schüttler (120 rpm) bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (6000 rpm, 3 min) in 1 ml YE-Medium aufgenommen und davon 100 µl bzw. 200 µl auf YE + G418-Platten ausplattiert. Die Platten wurden mehrere Tage bei 28  
45 °C bebrütet.

## 10. Reaktionsbedingungen für die PCR

Die Reaktionsbedingungen für die Polymerase Chain Reaction müssen für den Einzelfall optimiert werden und sind nicht uneingeschränkt für jeden Ansatz gültig. So kann unter anderem die eingesetzte Menge an DNA, die Salzkonzentrationen und die Schmelztemperatur variiert werden. Für unsere Problemstellung erwies es sich als günstig, in einem Eppendorfhütchen, das für den Einsatz im Thermocycler geeignet war, folgende Substanzen zu vereinigen: Zu 2 µl (= 0,1 U) Super Taq Polymerase wurden 5 µl Super Buffer, 8 µl dNTP's (je 0,625 µM), 5'-Primer, 3'-Primer und 0,2 µg Matritzen DNA, gelöst in soviel Wasser, daß sich ein Gesamtvolumen von 50 µl für den PCR Ansatz ergibt, zugegeben. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und mit einem Tropfen Öl überschichtet. Es wurden zwischen 37 und 40 Zyklen zur Amplifizierung gewählt.

15

## II. Beispiele

## Beispiel 1

Expression und Überexpression einer trunkierten HMG-CoA-Reduktase, einer Squalenepoxidase (ERG1) und/oder einer Lanosterol-C14-Demethylase (ERG11) teilweise unter Deletion von ERG5 und ERG6 in *S.cerevisiae* GRF18 bzw. GRFura3

## 1.1 Herstellung der Plasmide pFlat1 und pFlat3 und pFlat4

25

Zur Herstellung des Expressionsvektors pFlat3 wurde das Plasmid YEp24 (Naumovski L, Friedberg EC (1982) Molecular cloning of eucaryotic genes required for excision repair of UV-irradiated DNA: isolation and partial characterization of the RAD3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol Oct;152(1):323-31) linearisiert durch Restriktion mit *Sph*I und ein 900 bp *Sph*I Fragment aus dem Vektor pPT2B (Lang C, Looman AC. (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. Dec; 44(1-2): 147-56), welches den *ADH1* Promotor und den *TRP1* Terminator der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und eine Multiple-cloning-site aus dem Vektor pUC19 (Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 1985;33(1): 103-19.) enthält, integriert.

40

Die Multiple-cloning-site wurde durch einen Polylinker erweitert, der die Restriktionsstellen *Not*I und *Xho*I enthält. Der Polylinker wurde über die *Sal*I Schnittstelle des Vektors integriert. Das resultierende Plasmid heißt pFlat1.

45

Zur Herstellung des Vektors pFlat3 wurde der Vektor pFlat1 durch das Enzym *NcoI* linearisiert und mittels Klenow-Behandlung blund end gemacht. Anschliessend wurde aus dem Plasmid YDpL (Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P.A. and Hilger F. (1991)

- 5 The YDp Plasmids: a Uniform Set of Vectors Bearing Versatile Disruption Cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 7: 475-477.) ein mittels Klenow-Polymerase-Behandlung blund end gemachtes *BamHI*-Fragment, welches das *LEU2* Gen der Hefe enthält, integriert.

10

Zur Herstellung des Vektors pFlat4 wurde der Vektor pFlat1 durch das Enzym *NcoI* linearisiert und mittels Klenow-Behandlung blund end gemacht. Anschliessend wurde aus dem Plasmid YDPH (Berben et al., 1991) ein mittels Klenow-Polymerase-Behandlung blund end gemachtes *BamHI*-Fragment, welches das *HIS3* Gen der Hefe enthält, integriert.

15

1.2 Integration von *ERG1*, *ERG11*, *ERG4*, *ERG2* oder *ERG3* oder dem Gen der  $\Delta 24$ -Reduktase in die Vektoren pFlat1, pFlat3 und pFlat4

20

Zunächst wurde mittels PCR auf der 5' codierenden Seite der Gene *ERG1*, *ERG11*, *ERG4*, Delta24-Reduktase, *ERG2* oder *ERG3* eine *NotI* Restriktionsschnittstelle und auf der 3' codierenden Seite der Gene eine *XhoI* Restriktionsschnittstelle eingefügt und die ent-

- 25 sprechenden codierenden Bereiche amplifiziert. Anschliessend wurden die Amplifikate mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XhoI* behandelt. Parallel wurden die Plasmide pFlat1, pFlat3 und pFlat4 mit den Enzymen *NotI* und *XhoI* behandelt. Durch Ligation mit der T4-Ligase wurden daraufhin die geschnittenen Amplifikate in die
- 30 geschnittenen Plasmide integriert. Abbildung 7 zeigt beispielsweise das Plasmid pFLAT-3-*ERG4*.

Primer-Sequenzen für die Klonierung von *ERG1*, *ERG11*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, Delta24-Reduktase:

35

Primer *ERG1*-5' (SEQ. ID. No. 51):  
CTGCGGCCGC ATCATGTCTG CTGTTAACGT TGC

Primer *ERG1*-3' (SEQ. ID. No. 52):

- 40 TTCTCGAGTT AACCAATCAA CTCACCAAAC

Primer *ERG11*-5' (SEQ. ID. No. 53):  
CTGCGGCCGCAGGATGTCTGCTACCAAGTCAATCG

- 45 Primer *ERG11*-3' (SEQ. ID. No. 54):  
ATCTCGAGCTTAGATCTTTTGTCTGGATTTCTC

Primer ERG2-5' (SEQ. ID. No. 55):  
CTGCGGCCGCACCATGAAGTTTTTCCCACT CC

Primer ERG2-3' (SEQ. ID. No. 56):  
5 TTCTCGAGTTAGAACTTTTTGTTTTGCAACAAG

Primer ERG3-5' (SEQ. ID. No. 57):  
CTGCGGCCGCAATATGGATTGTTGCTTAGAAGTCG

10 Primer ERG3-3' (SEQ. ID. No. 58):  
AACTCGAGTCAGTTGTTCTTCTTGGTATTTG

Primer ERG4-5' (SEQ. ID. No. 59):  
CTGCGGCCGCACTATGGCAAAGGATAATAGTGAG

15 Primer ERG4-3' (SEQ. ID. No. 60):  
TTCTCGAGCTAGAAAACATAAGGAATAAAGAC

Primer Δ24R-5' (SEQ. ID. No. 47):  
20 CTGCGGCCGCAAGATGGAGCCCGCCGTGTCGC

Primer Δ24R-3' (SEQ. ID. No. 48):  
AACTCGAGTCAGTGCCTTGCCGCCTTGC

25 1.3 Herstellung der Integrationsvektoren pUG6-*tHMG*, pUG6-*ERG1*,  
pUG6-*ERG11*

#### 1.3.1 pUG6-*tHMG*

Die DNA-Sequenz für die Expressionskassette aus *ADH1*-Promotor-  
30 *tHMG*-Tryptophan-Terminator wurde aus dem Vektor YepH2 (Polakowski,  
T., Stahl, U., Lang, C. (1998): Overexpression of a cytosolic  
HMG-CoA reductase in yeast leads to squalene accumulation. Appl.  
Microbiol. Biotechnol. 49: 66-71.) durch Restriktion mit den Enzy-  
men *EcoRV* und *Bsp68I* (*NruI*) unter Verwendung von Standardmethoden  
35 isoliert. Das erhaltene DNA-Fragment wurde in den Vektor pUG6  
(Güldener, U et al. (1996): A new efficient gene disruption cas-  
sette for repeated use in budding yeast, Nucleic Acids Res. Jul  
1;24(13):2519-24) in die *EcoRV*-Schnittstelle blunt-end einklo-  
niert und ergab den Vektor mit der Bezeichnung pUG6-*tHMG* (Abbil-  
40 dung1).

#### 1.3.2 pUG6-*ERG1*

Die DNA-Sequenz für die Expressionskassette aus *ADH1*-Promotor-  
*ERG1*-Tryptophan-Terminator wurde aus dem Vektor pFlat3-*ERG1* durch  
45 Restriktion mit den Enzymen *NheI* und *Bsp68I* (*NruI*) unter Verwen-  
dung von Standardmethoden isoliert. Das erhaltene DNA-Fragment  
wurde nach einer Klenow-Behandlung in den Vektor pUG6 (Güldener, U

et al. (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, *Nucleic Acids Res.* Jul 1;24(13):2519-24) in die *EcoRV*-Schnittstelle Blunt-end einkloniert und ergab den Vektor mit der Bezeichnung pUG6-*ERG1* (Abbildung 2).

### 1.3.3 pUG6-*ERG11*

Die DNA-Sequenz für die Expressionskassette aus *ADH1*-Promotor-*ERG11*-Tryptophan-Terminator wurde aus dem Vektor pFlat3-*ERG11* durch Restriktion mit den Enzymen *EcoRV* und *Bsp68I* (*NruI*) unter Verwendung von Standardmethoden isoliert. Das erhaltene DNA-Fragment wurde in den Vektor pUG6 (Güldener, U et al. (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, *Nucleic Acids Res.* Jul 1;24(13):2519-24) in die *EcoRV*-Schnittstelle Blunt-end einkloniert und ergab den Vektor mit der Bezeichnung pUG6-*ERG11* (Abbildung 3).

### 1.4. Integrative Transformation der Expressionskassetten in die Hefestämme GRF oder GRFura3

Nach Plasmidisolation wurden Fragmente aus den Vektoren pUG6-*tHMG*, pUG6-*ERG1* und pUG6-*ERG11* mittels PCR so amplifiziert, dass die resultierenden Fragmente aus folgenden Komponenten bestehen: *loxP-kanMX-loxP-ADH1*-Promotor-Zielgen-Tryptophan-Terminator, wobei bei unter Zielgen *tHMG*, *ERG1* bzw. *ERG11* und unter *kanMX* ein Kanamycin-Resistenz-Gen verstanden wird.

Als Primer wurden Oligonukleotid-Sequenzen ausgewählt, die im anheulenden Bereich die Sequenzen jenseits der zu amplifizierenden Kassetten des Vektors pUG6-Zielgen enthalten und an den 5' und 3' Überhängend je 40 Basenpaare der 5' oder der 3' Sequenz des Integrationslocus enthalten. So ist gewährleistet, dass einerseits das gesamte Fragment inklusive *KanMX* und Zielgen amplifiziert wird und andererseits dieses Fragment anschließend in Hefe transformiert werden kann und durch homologe Rekombination in den Ziel-Genlocus der Hefe integriert. Dabei wurden je nach Ziel-Genlocus der Hefe die folgenden Oligonukleotid-Sequenzen als Primer verwendet:

Zur Integration an den *URA3* Genlocus:

*URA3*-Crelox-5' (SEQ. ID. No. 33):

5'-ATGTCGAAAG CTACATATAA GGAACGTGCT GCATCTCATC CCAGCTGAAG  
CTTCGTACGC-3'

45

*URA3*-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 34):

5'-TTAGTTTTTGC TGGCCGCATC TTCTCAAATA TGCTTCCCAG GCATAGGCCA CTAGTG-  
GATC TG-3'

Zur Integration an den LEU2 Genlocus:

5

LEU2-Crelox-5' (SEQ. ID. No. 35):

5'-GAATACTCAG GTATCGTAAG ATGCAAGAGT TCGAATCTCT CCAGCTGAAG  
CTTCGTACGC-3'

10 LEU2-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 36):

5'-TCTACCCTAT GAACATATTC CATTTTGTAA TTTCGTGTCTG GCATAGGCCA CTAGTG-  
GATC TG-3'

Zur Integration an den HIS3 Genlocus:

15

HIS3-Crelox-5' (SEQ. ID. No. 37):

5'-ATGACAGAGC AGAAAGCCCT AGTAAAGCGT ATTACAAATG CCAGCTGAAG  
CTTCGTACGC-3'

20 HIS3-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 38):

5'-CTACATAAGA ACACCTTTGG TGGAGGGAAC ATCGTTGGTA GCATAGGCCA CTAGTG-  
GATC TG-3'

Zur Integration an den ERG6 Genlocus:

25

ERG6-Crelox-5' (SEQ. ID. No. 39):

5'-ATGAGTGAAA CAGAATTGAG AAAAAGACAG GCCCAATTCA CCAGCTGAAG  
CTTCGTACGC-3'

30 ERG6-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 40):

5'-TTATTGAGTT GCTTCTTGGG AAGTTTGGGA GGGGGTTTCG GCATAGGCCA CTAGTG-  
GATC TG-3'

Zur Integration an den ERG5 Genlocus:

35

ERG5-Crelox-5' (SEQ. ID. No. 41):

5'-ATGAGTTCTG TCGCAGAAAA TATAATACAA CATGCCACTC CCAGCTGAAG  
CTTCGTACGC-3'

40 ERG5-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 42):

5'-TTATTCTGAAG ACTTCTCCAG TAATTGGGTC TCTCTTTTTCG GCATAGGCCA CTAGTG-  
GATC TG-3'

Als Selektionsmarker diente die Resistenz gegen Geneticin (G418).

45 Die resultierenden Stämme enthielten eine Kopie des jeweiligen Zielgens (*tHMG*, *ERG1* oder *ERG11*) unter der Kontrolle des *ADH*-Promotors und des Tryptophan-Terminators. Gleichzeitig war es mög-

lich, durch die Integration der Expressionskassette das jeweilige Gen des Ziellocus zu deletieren. Um das Gen für die Resistenz gegen G418 anschliessend wieder zu entfernen wurde der entstandene Hefestamm mit dem *cre* Rekombinase enthaltenden Vektor pSH47 (Gul-  
 5 dener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acids Res. Jul 1;24(13):2519-24.) transformiert. Durch diesen Vektor wurde die *cre* Rekombinase in der Hefe exprimiert, was zur Folge hatte, das der Sequenz-Bereich inner-  
 10 halb der beiden *loxP*-Sequenzen heraus rekombinierte, was wiederum zur Folge hatte, das lediglich eine der beiden *loxP*-Sequenzen und die *ADH1*-Promotor-ZielGen-Tryptophan-Terminator-Expressionskassetten in dem Ziel-Genlocus enthalten blieb.

15 Die Folge ist, dass der Hefestamm seine G418-Resistenz wieder verliert und damit geeignet ist, weitere Gene mittels dieses "cre-lox" Systems in den Hefestamm zu integrieren bzw. zu entfernen. Der Vektor pSH47 kann daraufhin durch Anzucht auf FOA-Medium selektiv entfernt werden.

20

Somit ist es möglich nacheinander mehrere Zielgene in den Hefestamm unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors und Tryptophan-Terminators an verschiedene Zielloci zu integrieren.

25 Zunächst wird ein Zielgen an den *URA3* Locus integriert bzw. wird ein *ura3*-Stamm verwendet, damit der Hefestamm Uracil auxotroph ist, da der Vektor pSH47 ein *URA3* Gen zur Selektion Uracil-prototropher Stämme enthält. Abbildung 4 zeigt ein methodisches Beispiel.

30

Durch diese Methode wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Hefe-Integrations- bzw. Deletionsstämme hergestellt, wobei, in an sich bekannter Weise, das Gen in Kleinbuchstaben für eine Deletion, das Gen in Großbuchstaben für eine Integration steht.

35

Tabelle 1

Nr.	Stammbezeichnung	Veränderung gegenüber Hefestamm GRF
40	I	GRFtH1
	II	GRFtH1E1
	III	GRFtH1E11
	IV	GRFtH1E1E11
45	V	GRFtH1E1E11erg5erg6
	VI	GRFtH1erg5erg6



Die Hefestämme wurden 48 Stunden lang in WMVIII- Medium bei 28°C und 160 rpm in einem Kulturvolumen von 20 ml kultiviert. Anschliessend wurden 500 µl dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikanekolben kultiviert.

Die Sterole und Squalen wurden nach 3 Tagen extrahiert (Parks LW, Bottema CD, Rodriguez RJ, Lewis TA. (1985) Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. Methods Enzymol. 1985;111:333-46.) und mittels Gaschromatographie analysiert. Es ergaben sich folgende Werte (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2

Nr	Stammbezeichnung	Gehalt an Sterolen 1 bis 11 in [Peakfläche/gTS]										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
I	GRFtH1	9,9	0,8	0,3	1,2	1,1	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,7
II	GRFtH1E1	6,8	1,9	0,4	1,5	2,2	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9
II	GRFtH1E11	9,9	0,4	0,7	2,3	1,9	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
I												
IV	GRFtH1E1E11	6,0	1,2	0,9	3,0	2,3	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	7,2
V	GRFtH1E1E11	5,8	0,8	0,4	23,1	0,0	0,0	0,0	0,0	11,8	0,0	0,0
erg5erg6												
VI	GRFtH1erg5erg6	9,9	0,8	0,3	12,6	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0

- 1 = Squalen  
 2 = Lanosterol  
 3 = Dimethyl-Zymosterol  
 4 = Zymosterol  
 5 = Fecosterol  
 6 = Episterol  
 7 = Cholesta-7,24-dienol  
 8 = Cholesta-8-enol  
 9 = Cholesta-5,7,24 trienol  
 10 = 7-Dehydrocholesterol  
 11 = Ergosterol

#### Beispiel 2

Expression des heterologen Gens kodierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase (Ebp) aus der Maus (*Mus musculus*) in Hefe

- Die cDNA-Sequenz der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase aus *Mus musculus* (Moebius, F.F., Soellner, K.E.M., Fiechter, B., Huck, C.W., Bonn, G., Glossmann, H. (1999): Histidine77, Glutamic Acid123, Threo-

nine126, Asparagine194, and Tryptophan197 of Human Emopamil Protein Are Required for in Vivo Sterol  $\Delta 8$ - $\Delta 7$  Isomerisation. Biochem. 38, 1119-1127.) wurde durch PCR aus dem cDNA-Klon IMAGp998A22757 (Host: *E.coli* DH10B) des Deutschen Ressourcenzentrums für Genom-  
5 forschung GmbH (Berlin) amplifiziert.

Die hierbei verwendeten Primer sind die DNA-Oligomere Ebp-5' (SEQ. ID. No. 43) und Ebp-3' (SEQ. ID. No. 44). Das erhaltene DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XhoI* be-  
10 handelt und anschliessend in den Vektor pFlat3 und pFlat1 (Abbildung 4), die zuvor ebenfalls mit den Enzymen *NotI* und *XhoI* behandelt wurden, mittels einer Ligase-Reaktion integriert. Die resultierenden Vektoren pFlat1-EBP und pFlat3-EBP (Abbildung 5a) enthalten das EBP-Gen unter der Kontrolle des ADH-Promotors und des  
15 Tryptophan-Terminators.

Der Expressionsvektor pFlat3-EBP wurde anschließend in die Hefestämme I bis VI der Tabelle 1 aus Beispiel 1 sowie in den Stamm GRFura3 transformiert. Die so gewonnenen Hefestämme wurden an-  
20 schliessend 48 Stunden lang in WMVIII- Medium bei 28°C und 160 rpm in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 500 µl dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikane-  
nekolben kultiviert.

25 Die Sterole wurden wie in Beispiel 1 beschrieben nach 3 Tagen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Der Einfluss der Expression einer  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase aus *Mus musculus* in Kombination mit der Expression der transkriptionell deregulierten hefe-  
eigenen Gene *tHMG* und/oder *ERG1* und/oder *ERG11* und/oder der Dele-  
30 tion der hefeeigenen Gene *ERG6* und *ERG5* ist in Tabelle 3 aufgelistet. Die Abkürzungen bedeuten: - = Abnahme; 0 = keine Veränderung; / = nicht vorhanden; +, ++, +++, ++++ = angereichert bis stark angereichert.

35

40

45

Tabelle 3

Nr	Stammbezeichnung	Einfluß der genetischen Veränderungen auf den Sterolgehalt gegenüber dem Hefe- Stamm GRF										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
VII	GRFtH1 pFlat3-Ebp	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/	0
VIII	GRFtH1E1 pFlat3-Ebp	0	0	0	-	0	0	+	/	/	/	0
IX	GRFtH1E11 pFlat3-Ebp	0	0	0	-	0	0	+	/	/	/	0
X	GRFtH1E1E11 pFlat3-Ebp	0	0	0	-	0	0	+	/	/	/	0
XI	GRFtH1E1E11erg5e rg6 pFlat3-Ebp	0	0	0	--	/	/	+	/	++	/	/
XII	GRFtH1erg5erg6 pFlat3-Ebp	0	0	0	-	/	/	+	/	+	/	/

20

1 = Squalen

2 = Lanosterol

3 = Dimethyl-Zymosterol

4 = Zymosterol

25 5 = Fecosterol

6 = Episterol

7 = Cholesta-7,24-dienol

8 = Cholesta-8-enol

9 = Cholesta-5,7,24 trienol

30 10 = 7-Dehydrocholesterol

11 = Ergosterol

## Beispiel 3

Expression des heterologen Gens kodierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase35 (Sc5d) aus der Maus (*Mus musculus*) in Hefe

Die cDNA-Sequenz der  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Mus musculus* (Nishi, S., Hideaki, N., Ishibashi, T. (2000): cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant. Biochim. Biophys. A 1490, 106-108.) wurde durch PCR aus dem cDNA-Klon IMAGp998K144618 (Host: *E. coli* DH10B) des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (Berlin) amplifiziert. Die hierbei verwendeten Primer sind die DNA-Oligomere Sc5d-5' (SEQ. ID. No. 45) und Sc5d-3' (SEQ. ID. No. 46). Das erhaltene DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XhoI* behandelt und anschliessend in den Vektor pFlat3 (Abbildung 4), der zuvor ebenfalls mit den Enzymen *NotI* und *XhoI* behandelt wurde, mittels ei-

ner Ligase-Reaktion integriert. Der resultierende Vektor pFlat3-SC5D (Abbildung 5b) enthält das SC5D-Gen unter der Kontrolle des ADH-Promotors und des Tryptophan-Terminators.

- 5 Der Expressionsvektor pFlat3-SC5D wurde anschliessend in die Hefestämme I bis VI der Tabelle 1 aus Beispiel 1 sowie in den Stamm GRFura3 transformiert. Die so gewonnenen Hefestämme wurden anschliessend 48 Stunden lang in WMVIII-Medium bei 28°C und 160 rpm in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden
- 10 500 µl dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikanekolben kultiviert.

- Die Sterole wurden wie in Beispiel 1 beschrieben nach 3 Tagen ex-
- 15 trahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Der Einfluss der Expression einer  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Mus musculus* in Kombination mit der Expression der transkriptionell deregulierten hefe-eigenen Gene *tHMG* und/oder *ERG1* und/oder *ERG11* und/oder der Deletion der hefe-eigenen Gene *ERG6* und *ERG5* ist in Tabelle 4 aufgeli-
- 20 stet. Die Abkürzungen bedeuten: - = Abnahme; 0 = keine Veränderung; / = nicht vorhanden; +, ++, +++, ++++ = angereichert bis stark angereichert.

Tabelle 4

Nr	Stammbezeichnung	Einfluß der genetischen Veränderungen auf den Sterolgehalt gegenüber dem Hefestamm GRF										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
XIII	GRFth1 pFlat3-Sc5d	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/	0
XIV	GRFth1E1 pFlat3-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
XV	GRFth1E11 pFlat3-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
XVI	GRFth1E1E11 pFlat3-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
XVII	GRFth1E1E11erg5e rg6 pFlat3-Sc5d	0	-	0	-- -	/	/	/	/	++ +	+	/
XVIII	GRFth1erg5erg6 pFlat3-Sc5d	0	0	0	--	/	/	/	/	++	/	/

- 1 = Squalen
- 45 2 = Lanosterol
- 3 = Dimethyl-Zymosterol
- 4 = Zymosterol

- 5 = Fecosterol
- 6 = Episterol
- 7 = Cholesta-7,24-dienol
- 8 = Cholesta-8-enol
- 5 9 = Cholesta-5,7,24 trienol
- 10 = 7-Dehydrocholesterol
- 11 = Ergosterol

#### Beispiel 4

- 10 Expression des heterologen Gens kodierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase (D24R) aus der Maus (*Mus musculus*) in Hefe

- Die cDNA-Sequenz der  $\Delta 24$ -Reduktase aus *Mus musculus* (Waterham, H.R., Koster, J., Romeijn, G.J., Hennekam, R.C., Vreken, P., Andersson, H.C., FitzPatrick, D.R., Kelley, R.I. and Wanders, R.J., 15 Mutations in the 3 $\beta$ -Hydroxysterol Delta24-Reductase Gene Cause Desmosterolosis, an Autosomal Recessive Disorder of Cholesterol Biosynthesis, Am. J. Hum. Genet. 69 (4), 685-694 (2001)) wurde durch PCR aus dem cDNA-Klon IMAGp998K179532 (Host: *E. coli* DH10B) 20 des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (Berlin) amplifiziert.

- Die hierbei verwendeten Primer sind die DNA-Oligomere D24R-5' (SEQ. ID. No. 47) und D24R-3' (SEQ. ID. No. 48). Das erhaltene 25 DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XhoI* behandelt und anschliessend in den Vektor pFlat4 (Abbildung 6), der zuvor ebenfalls mit den Enzymen *NotI* und *XhoI* behandelt wurde, mittels einer Ligase-Reaktion integriert. Der resultierende Vektor pFlat4-D24R (Abbildung 5d) enthält das D24R-Gen unter der 30 Kontrolle des *ADH1*-Promotors und des Tryptophan-Terminators.

- Der Expressionsvektor pFlat4-D24R wurde anschliessend in die Hefestämme I bis VI der Tabelle 1 aus Beispiel 1 sowie in den Stamm GRFura3 transformiert. Die so gewonnenen Hefestämme wurden an- 35 schliessend 48 Stunden lang in WMVIII-Medium bei 28°C und 160 rpm in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 500  $\mu$ l dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schi- 40 kanekolben kultiviert.

- Die Sterole wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, nach 3 Tagen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Der Einfluss der Expression einer  $\Delta 24$ -Reduktase aus *Mus musculus* in Kombination mit der Expression der transkriptionell deregulierten 45 hefeeigenen Gene *thMG* und/oder *ERG1* und/oder *ERG11* und/oder der Deletion der hefeeigenen Gene *ERG6* und *ERG5* ist in Tabelle 5 aufgelistet. Die Abkürzungen bedeuten: - = Abnahme; 0 = keine Verän-

derung; / = nicht vorhanden; +, ++, +++, ++++ = angereichert bis stark angereichert.

Tabelle 5

Nr	Stammbezeichnung	Einfluß der genetischen Veränderungen auf den Sterolgehalt gegenüber dem Hefe-Stamm GRF										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
XIX	GRFtH1 pFlat4-D24R	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/	0
XX	GRFtH1E1 pFlat4-D24R	0	-	-	-	0	0	/	/	/	+	0
XXI	GRFtH1E11 pFlat4-D24R	0	0	0	-	0	0	/	+	/	+	0
XXII	GRFtH1E1E11 pFlat4-D24R	0	0	0	-	0	0	/	+	/	+	0
XXIII	GRFtH1E1E11erg5e rg6 pFlat4-D24R	0	-	-	-	/	/	0	+	+	++	/
XXIV	GRFtH1erg5erg6 pFlat4-D24R	0	-	-	-	/	/	0	+	+	++	/

1 = Squalen

25 2 = Lanosterol

3 = Dimethyl-Zymosterol

4 = Zymosterol

5 = Fecosterol

6 = Episterol

30 7 = Cholesta-7,24-dienol

8 = Cholesta-8-enol

9 = Cholesta-5,7,24 trienol

10 = 7-Dehydrocholesterol

11 = Ergosterol

35

#### Beispiel 5

Gemeinsame Expression der heterologen Gene kodierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$  Isomerase (Ebp) aus der Maus (*Mus musculus*) und eine C5-Desaturase (Sc5d) aus der Maus (*Mus musculus*) in Hefe

40

Die Expressionsvektoren pFlat1-EBP (aus Beispiel 2) und pFlat3-SC5D (aus Beispiel 3) wurden in die Hefestämme I bis VI der Tabelle 1 aus Beispiel 1 sowie in den Stamm GRFura3 transformiert. Die so gewonnenen Hefestämme wurden anschliessend 48 Stunden lang in WMVIII-Medium bei 28°C und 160 rpm in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 500 µl dieser Vor-  
kultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt

und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikanekolben kultiviert.

Die Sterole wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, nach 3 Tagen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Der Einfluss der Expression einer  $\Delta 8$ - $\Delta 7$  Isomerase und einer C5-Desaturase aus *Mus musculus* in Kombination mit der Expression der transkriptionell deregulierten hefeeigenen Gene *tHMG* und/oder *ERG1* und/oder *ERG11* und/oder der Deletion der hefeeigenen Gene *ERG6* und *ERG5* ist in Tabelle 6 aufgelistet. Die Abkürzungen bedeuten: - = Abnahme; 0 = keine Veränderung; / = nicht vorhanden; +, ++, +++, ++++ = angereichert bis stark angereichert.

Tabelle 6

Nr.	Stammbezeichnung	Einfluß der genetischen Veränderungen auf den Sterolgehalt gegenüber dem Hefe-Stamm GRF										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
XXV	GRFtH1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
XXVI	GRFtH1E1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	-	0	--	0	0	/	/	+	/	0
XXVII	GRFtH1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	0	0	--	0	0	/	/	+	/	0
XXVII I	GRFtH1E1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	-	-	--	0	0	/	/	++	/	0
XXIX	GRFtH1E1E11erg5e rg6 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	-	0	--	/	/	/	/	++ +	+	/
XXX	GRFtH1erg5erg6 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	0	0	-	/	/	/	/	++	+	/

1 = Squalen

2 = Lanosterol

3 = Dimethyl-Zymosterol

4 = Zymosterol

5 = Fecosterol

6 = Episterol

7 = Cholesta-7,24-dienol

8 = Cholesta-8-enol

9 = Cholesta-5,7,24 trienol

10 = 7-Dehydrocholesterol

11 = Ergosterol

#### Beispiel 6

- 5 Gemeinsame Expression der heterologen Gene kodierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$  Isomerase (Ebp) aus der Maus (*Mus musculus*), kodierend eine C5-Desaturase (Sc5d) aus der Maus (*Mus musculus*) und eine  $\Delta 24$ -Reduktase aus der Maus (*Mus musculus*) in Hefe
- 10 Die Expressionsvektoren pFlat1-EBP (aus Beispiel 2) und pFlat3-SC5D (aus Beispiel 3) und pFlat4-D24R (aus Beispiel 4) wurden in die Hefestämme I bis VI der Tabelle 1 aus Beispiel 1 sowie in den Stamm GRFura3 transformiert. Die so gewonnenen Hefestämme wurden anschliessend 48 Stunden lang in WMVIII- Medium bei
- 15 28°C und 160 rpm in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 500  $\mu$ l dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikanekolben kultiviert.
- 20 Die Sterole wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, nach 3 Tagen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Der Einfluss der Expression einer  $\Delta 8$ - $\Delta 7$  Isomerase, einer C5-Desaturase und einer  $\Delta 24$ -Reduktase aus *Mus musculus* in Kombination mit der Expression der transkriptionell deregulierten hefeeigenen Gene
- 25 *tHMG* und/oder *ERG1* und/oder *ERG11* und/oder der Deletion der hefeeigenen Gene *ERG6* und *ERG5* ist in Tabelle 7 aufgelistet. Die Abkürzungen bedeuten: - = Abnahme; 0 = keine Veränderung; / = nicht vorhanden; +, ++, +++, +++++ = angereichert bis stark angereichert.

30

Tabelle 7

35	Nr	Stammbezeichnung	Einfluß der genetischen Veränderungen auf den Sterolgehalt gegenüber dem Hefestamm GRF										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
40	XXXI	GRFtH1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	0	0	-	0	0	/	/	/	+	0
	XXXII	GRFtH1E1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	-	0	--	0	0	/	/	/	+	0
45													



86

5	XXXII I	GRFtH1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	0	0	--	0	0	/	/	/	+	0
	XXXIV	GRFtH1E1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	-	-	--	0	0	/	/	/	++	0
	XXXV	GRFtH1E1E11erg5e rg6 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	-	0	-- -	/	/	/	/	+	++ ++	/
	XXXVI	GRFtH1erg5erg6 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	0	0	-	/	/	/	/	++	++ +	/

1 = Squalen

2 = Lanosterol

3 = Dimethyl-Zymosterol

20 4 = Zymosterol

5 = Fecosterol

6 = Episterol

7 = Cholesta-7,24-dienol

8 = Cholesta-8-enol

25 9 = Cholesta-5,7,24 trienol

10 = 7-Dehydrocholesterol

11 = Ergosterol

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Organismen die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens zwei der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren, codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, in den Organismus einbringt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase aufweisen.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 5 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase, in den Organismus einbringt.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von
- 15 Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\Delta 5$ -Desaturase aufweisen.
- 20 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 3 einbringt.
- 25 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase, in den Organismus einbringt.
- 35 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID.
- 40 NO. 6, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\Delta 24$ -Reduktase aufweisen.
- 45 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 5 einbringt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe C24-Methyltransferase-Aktivität und  $\Delta$ 22-Desaturase-Aktivität aufweisen.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität und eine reduzierte  $\Delta$ 22-Desaturase-Aktivität aufweisen.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Reduzierung der C24-Methyltransferase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine C24-Methyltransferase gegenüber dem Wildtyp reduziert.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Organismus verwendet, der kein funktionelles C24-Methyltransferase-Gen aufweist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Reduzierung der  $\Delta$ 22-Desaturase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine  $\Delta$ 22-Desaturase gegenüber dem Wildtyp reduziert.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Organismus verwendet, der kein funktionelles  $\Delta$ 22-Desaturase-Gen aufweist.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität, Squalensynthetase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität aufweisen.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen.
24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase gegenüber dem Wildtyp erhöht.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, in den Organismus einbringt.
- 5 26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8, und die die enzymatische Eigenschaft einer Lanosterol-C14-Demethylase aufweisen.
- 10 27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 7 einbringt.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 25 29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase in den Organismus einbringt, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp, einer reduzierten Regulation unterliegt.
- 30 30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäurekonstrukt einen Promotor enthält, der in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp-Promotor, einer reduzierten Regulation unterliegt.
- 35 31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit der Organismus eigenen, orthologen Nukleinsäure, einer reduzierten Regulation unterliegt.
- 40 32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, die den katalytischen Bereich der HMG-CoA-Reduktase kodiert.
- 45

33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 10 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 10, und die die enzymatische Eigenschaft einer HMG-CoA-Reduktase aufweisen.
34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 9 einbringt.
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Organismus verwendet, der zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität aufweist.
36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Squalenepoxidase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalenepoxidase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, in den Organismus einbringt.
38. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 12, und die die enzymatische Eigenschaft einer Squalenepoxidase aufweisen.
39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 11 einbringt.
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus Hefe verwendet.
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Kultivieren den Organismus erntet und anschließend 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen bio-

synthetische Zwischen- und/oder Folgeprodukte aus dem Organismus isoliert.

- 5 42. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase und Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
- 10
- 15 43. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 42, enthaltend zusätzlich mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
- 20
- 25 44. Kombination aus Nukleinsäurekonstrukten, wobei die Kombination mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe A bis C
- 30 A Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 35 B Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten und
- 40 C Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 45 und mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe D bis H

## 93

- 5           D     Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 10           E     Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 15           F     Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 20           G     Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 25           H     Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten
- 30           umfasst.
45.   Nukleinsäurekonstrukte oder Kombination von Nukleinsäurekonstrukten gemäß einem der Ansprüche 42 bis 44, dadurch gekennzeichnet, daß die Regulationssignale einen oder mehrere
- 35   Promotoren und einen oder mehrere Terminatoren enthalten, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
46.   Nukleinsäurekonstrukte oder Kombination von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, daß man Regulationssignale verwendet, die die Transkription und Translation in Hefen gewährleisten.
- 45



47. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität,  $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und  $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp erhöht.
- 5 48. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
- 10 49. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine  $\Delta 5$ -Desaturase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren kodierend eine  $\Delta 24$ -Reduktase enthält.
- 15 50. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 47 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe C24-Methyltransferase-Aktivität und Delta22-Desaturase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp reduziert.
- 20 25 51. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß die Reduzierung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Reduzierung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine C24-Methyltransferase und Nukleinsäuren codierend eine Delta22-Desaturase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
- 30 52. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus kein funktionelles C24-Methyltransferase-Gen und/oder Delta22-Desaturase-Gen aufweist.
- 35 53. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 47 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität, Squalensynthetase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität, gegenüber einem Wildtyp erhöht.
- 40 45

54. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
55. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase enthält.
56. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 47 bis 56, dadurch gekennzeichnet, daß der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aufweist.
57. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 47 bis 56, dadurch gekennzeichnet daß man als Organismus Hefe verwendet.
58. Verwendung eines genetisch veränderten Organismus nach einem der Ansprüche 47 bis 57 zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten.

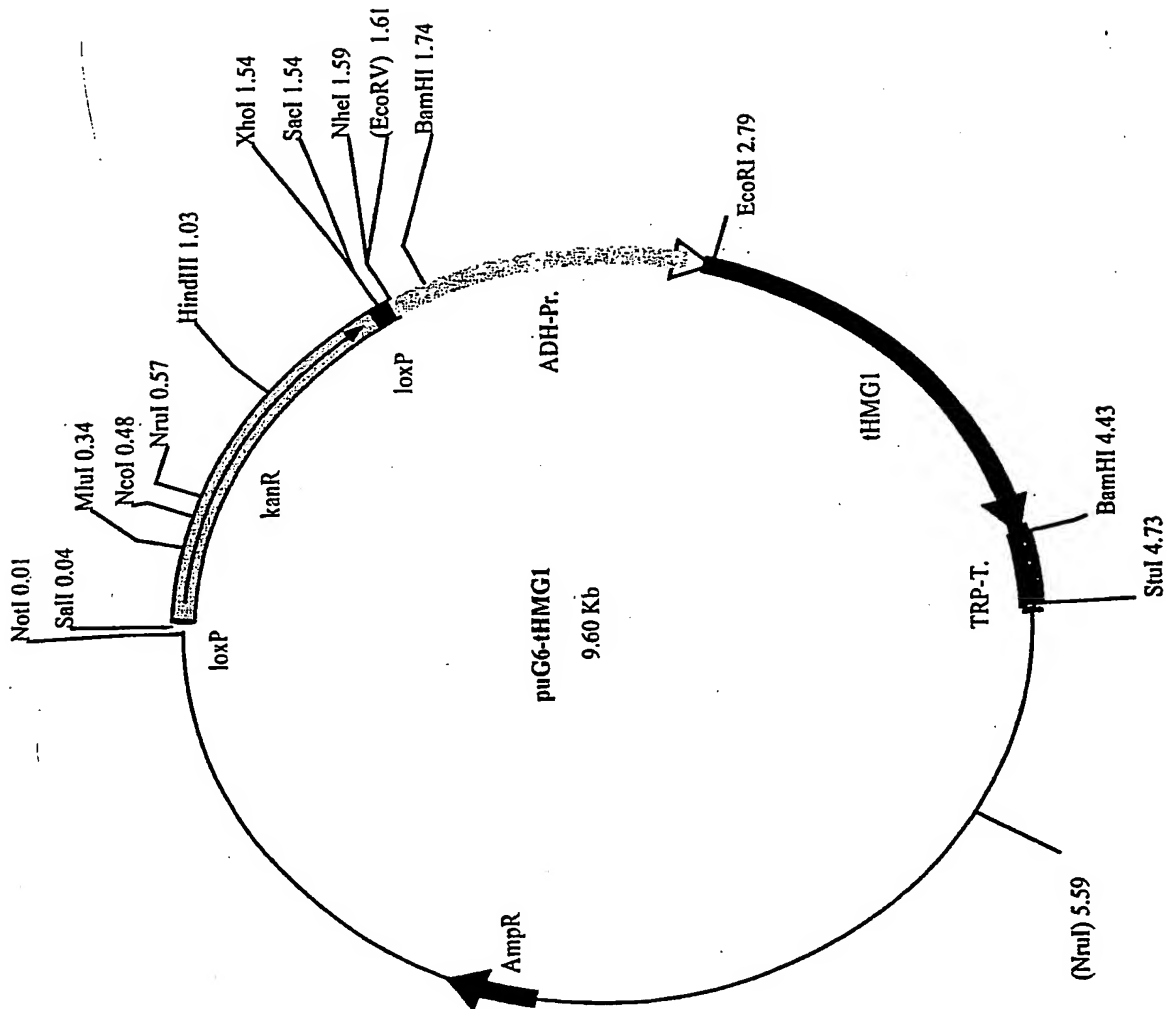


Abbildung 1

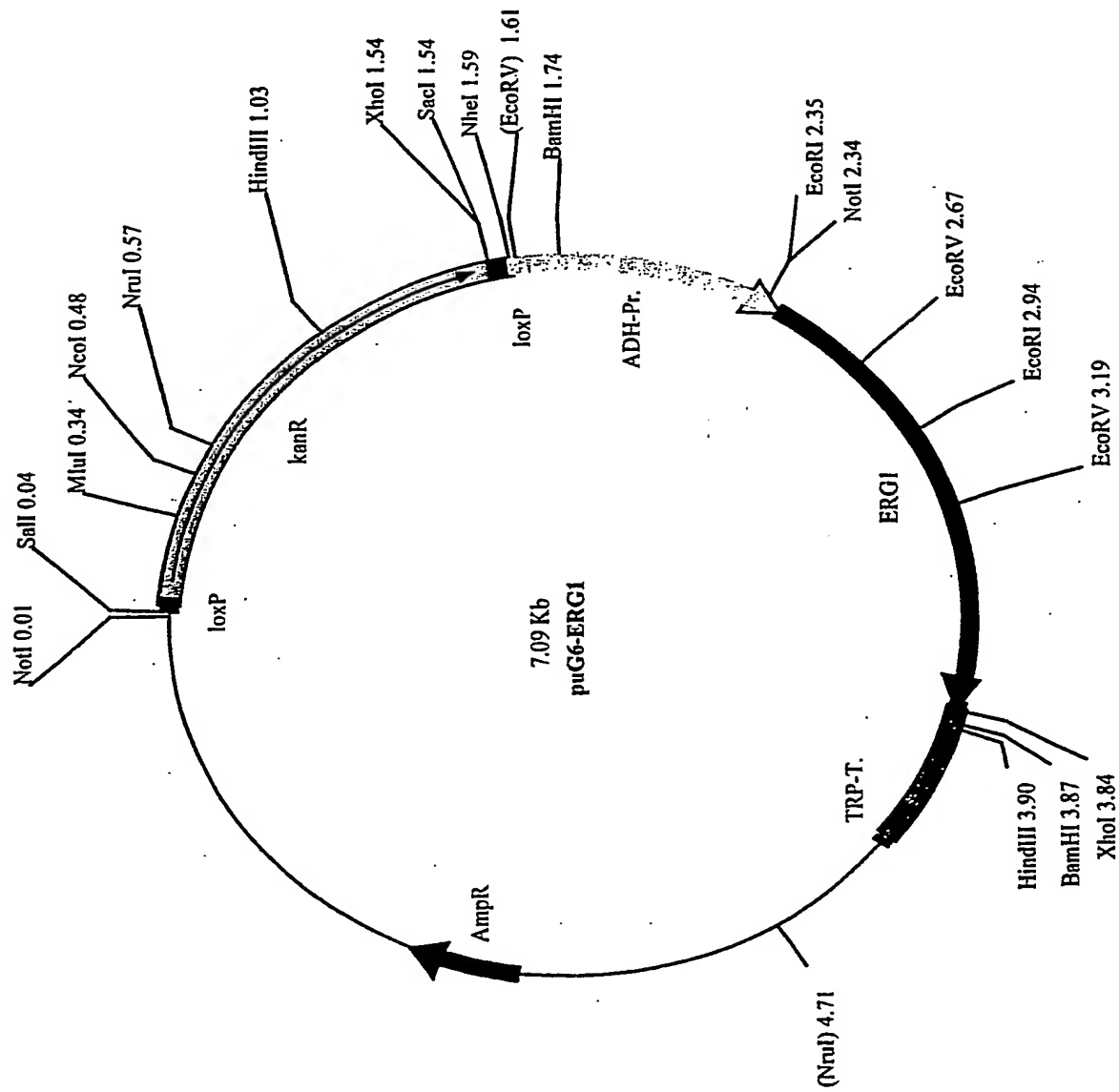


Abbildung 2

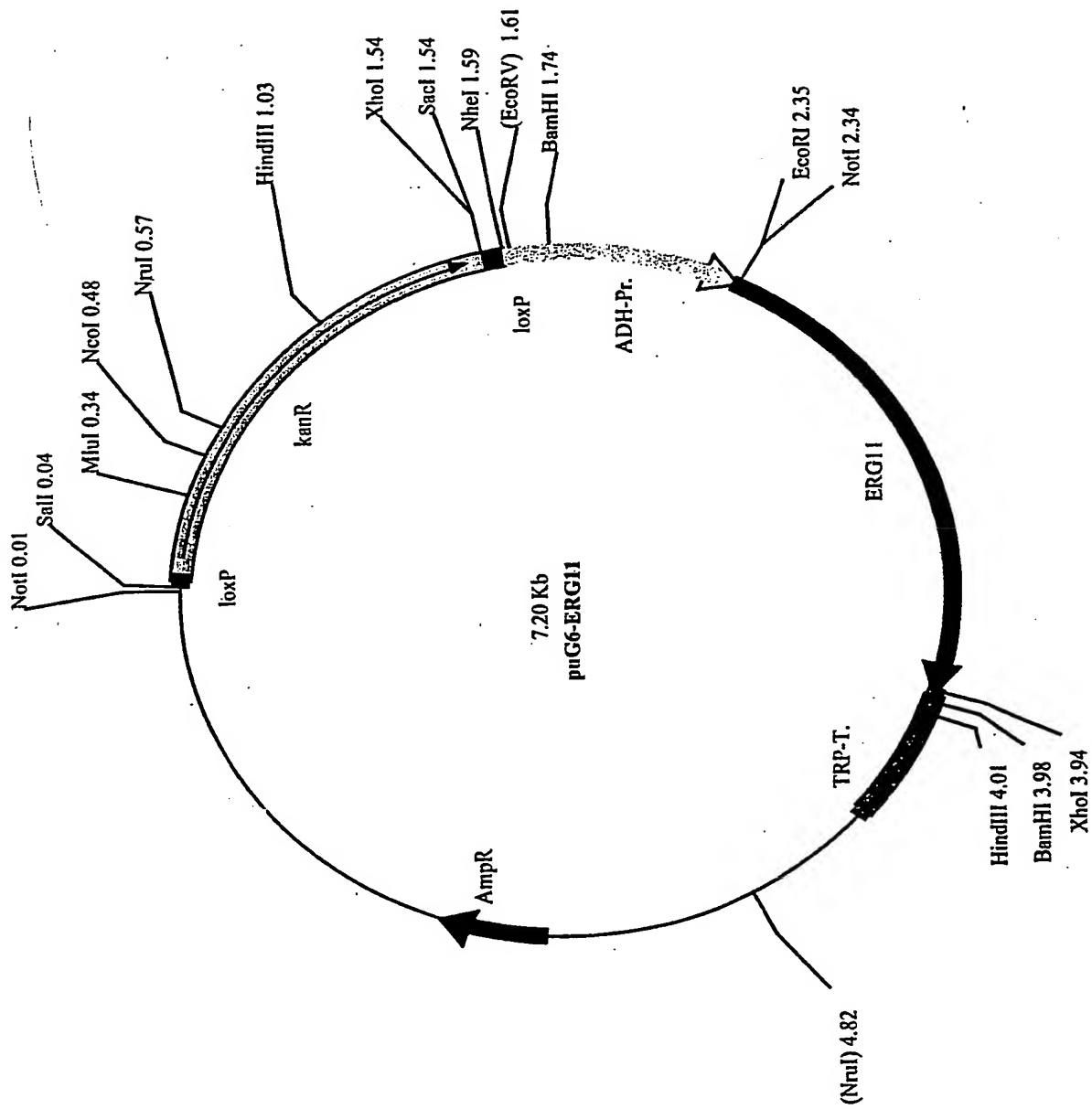
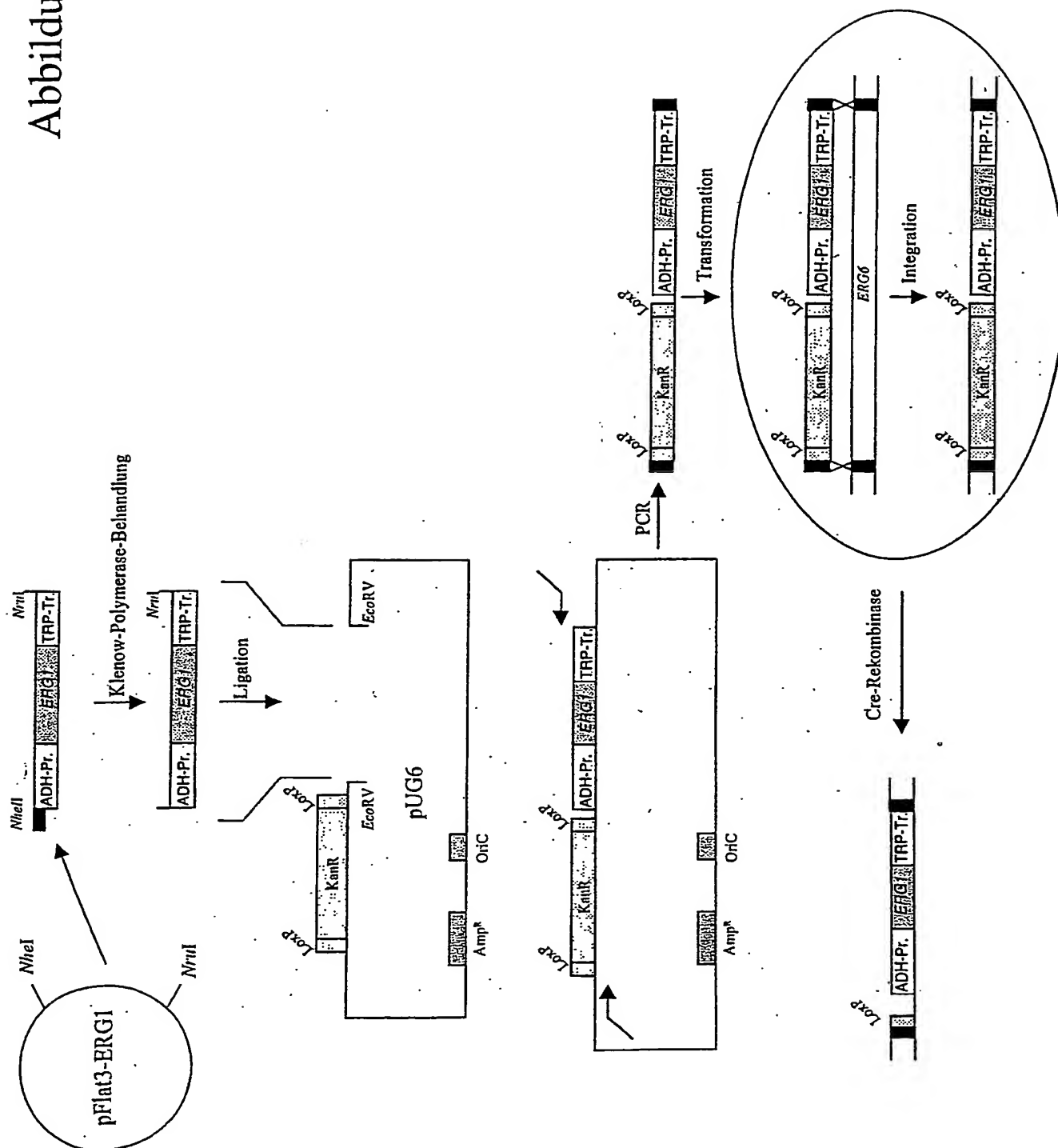


Abbildung 3

## Abbildung 4



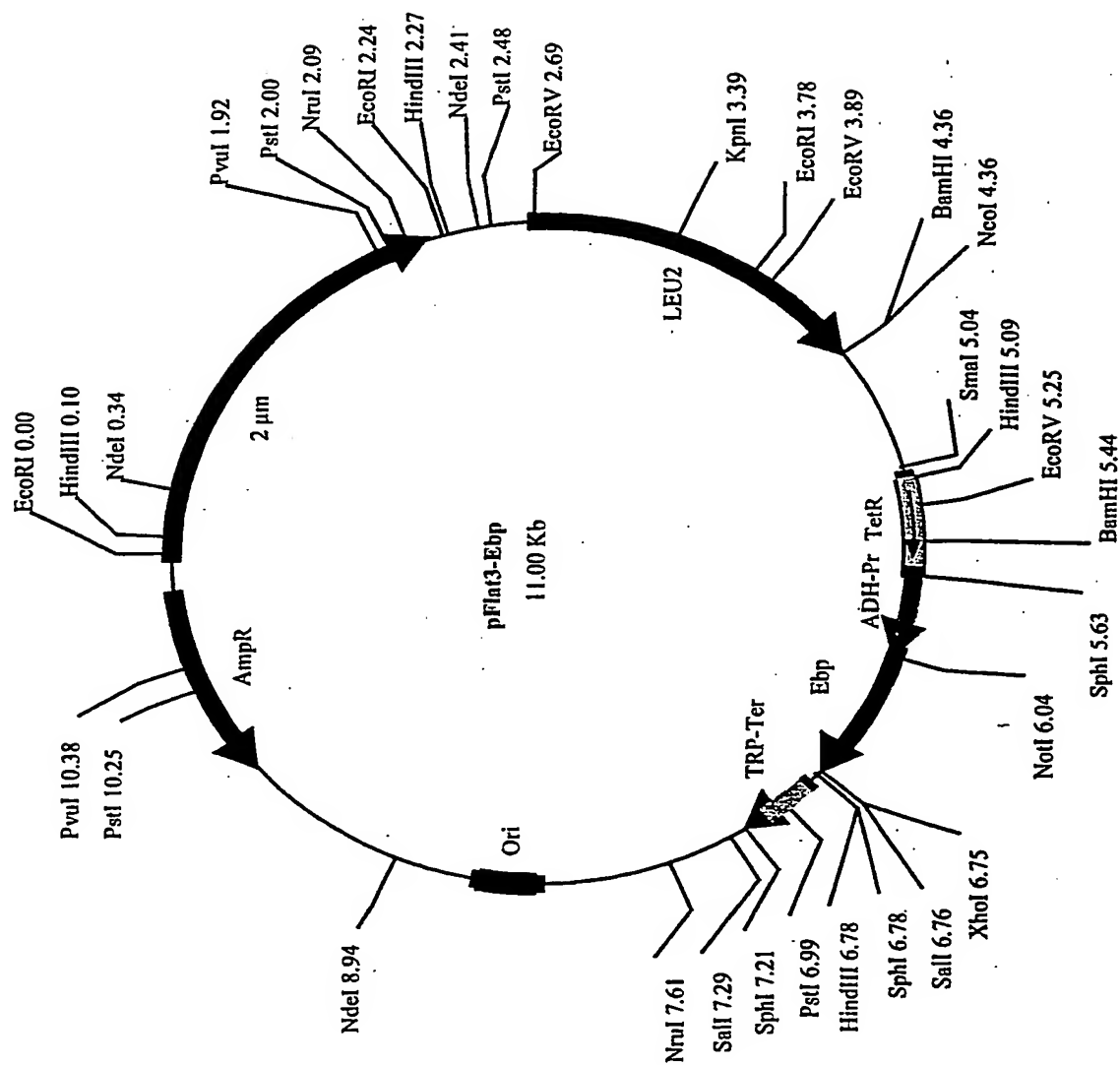


Abbildung 5a

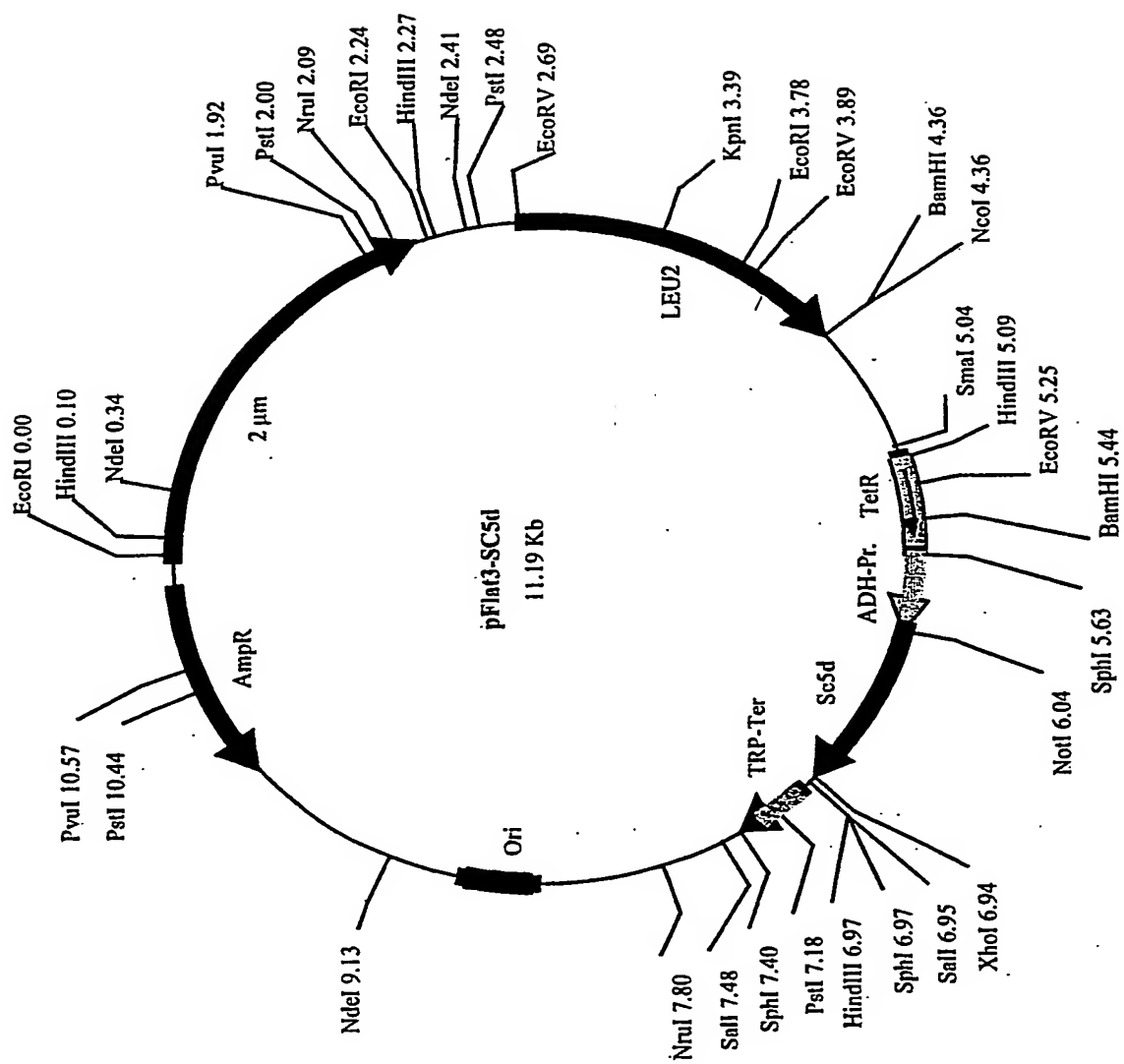


Abbildung 5b



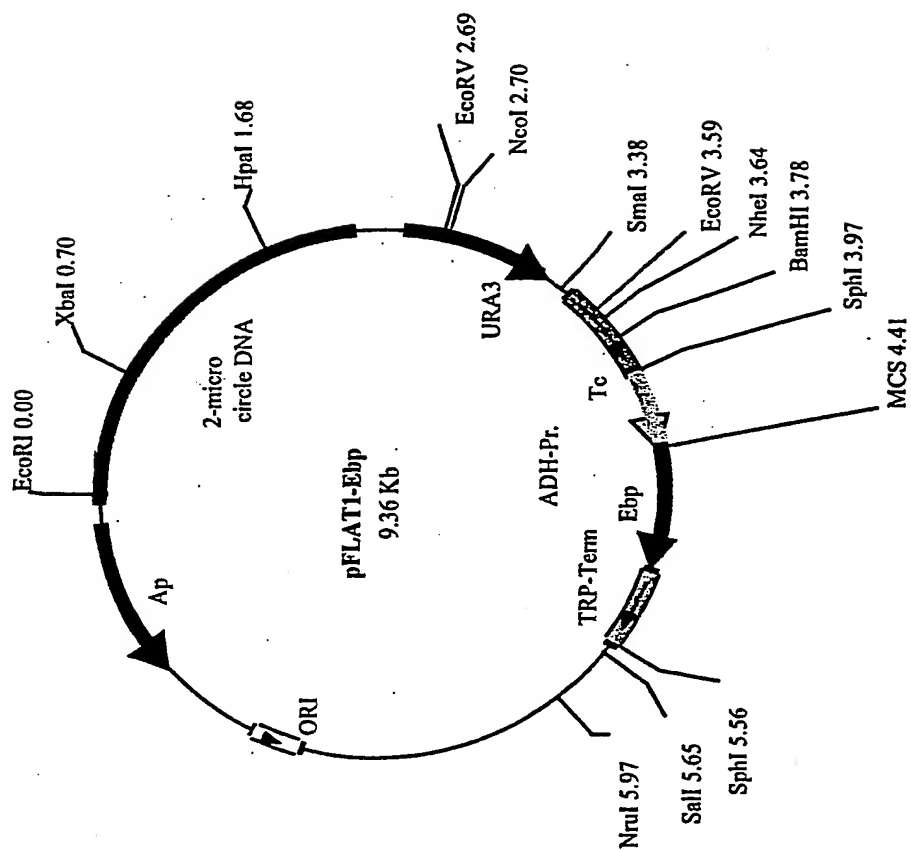


Abbildung 5c

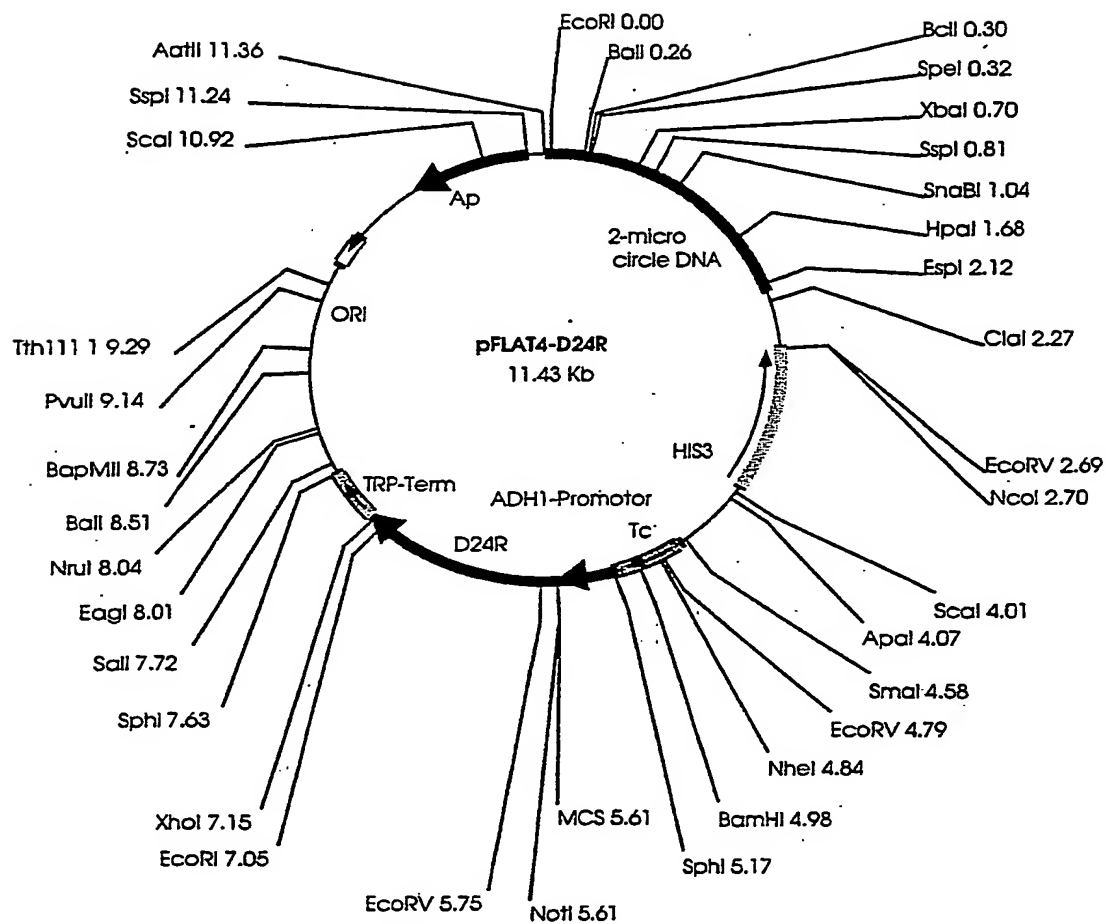


Abbildung 5d

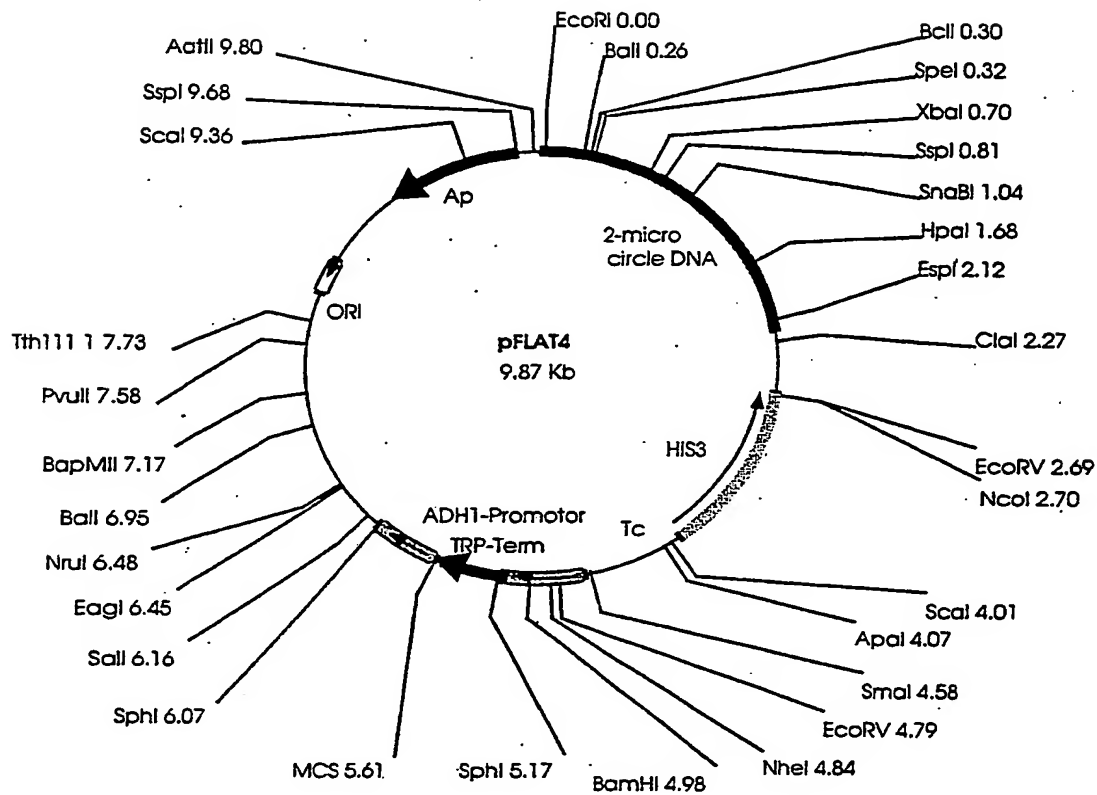


Abbildung 6

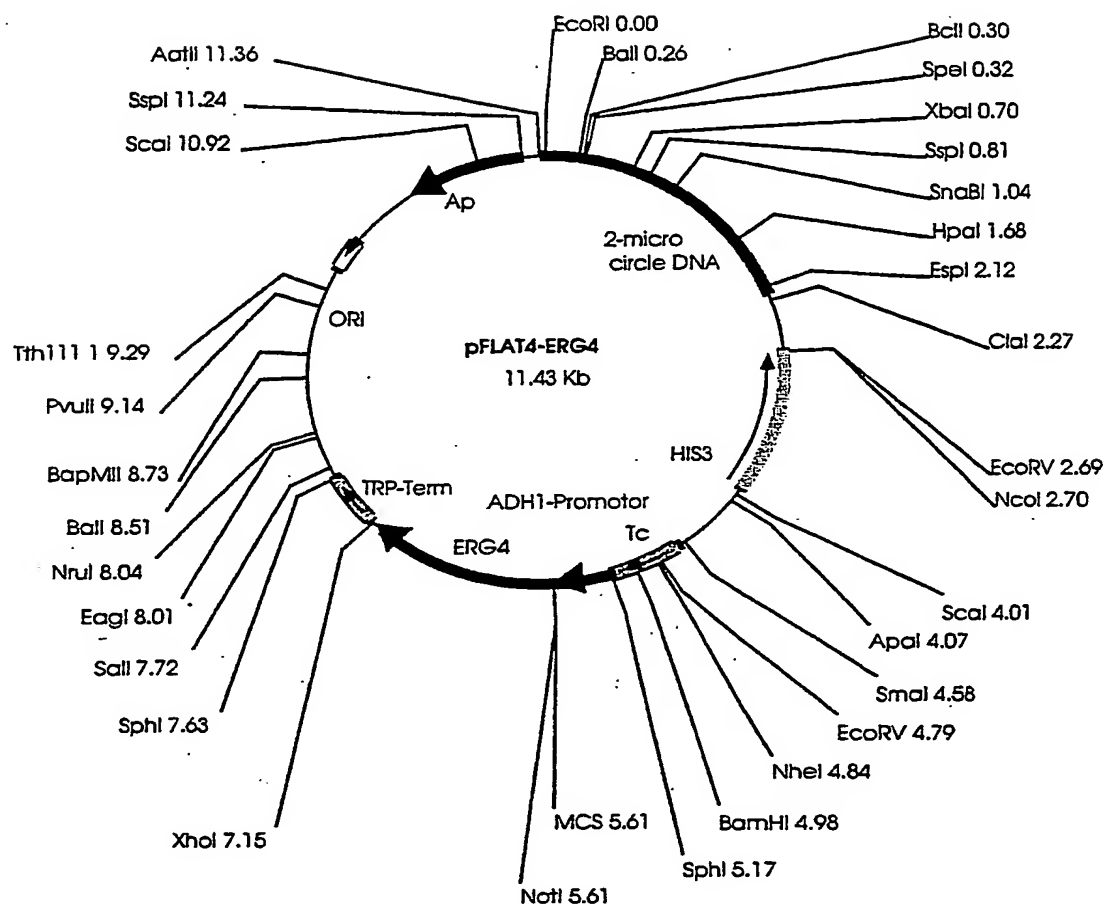


Abbildung 7

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Aktiengesellschaft

<120> Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol  
und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder  
Folgeprodukten in transgenen Organismen

&lt;130&gt; 0050

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 60

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 693

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(693)

&lt;400&gt; 1

atg acc acc aat acg gtc ccc ttg cac ccg tac tgg ccc agg cac ctg	48
Met Thr Thr Asn Thr Val Pro Leu His Pro Tyr Trp Pro Arg His Leu	
1 5 10 15	
aag ctg gac aac ttc gtg cct aat gac ctc ccg act tcg cat atc ctg	96
Lys Leu Asp Asn Phe Val Pro Asn Asp Leu Pro Thr Ser His Ile Leu	
20 25 30	
gtt ggc ctc ttc tcc atc tct ggg ggc cta att gtg atc acg tgg ctg	144
Val Gly Leu Phe Ser Ile Ser Gly Gly Leu Ile Val Ile Thr Trp Leu	
35 40 45	
ttg tct agc cga gct tcc gtc gtc cca ctt gga gct ggg cgg cga ctg	192
Leu Ser Ser Arg Ala Ser Val Val Pro Leu Gly Ala Gly Arg Arg Leu	
50 55 60	
gcc ttg tgc tgg ttt gct gtg tgt acc ttc att cac ctt gtg atc gag	240
Ala Leu Cys Trp Phe Ala Val Cys Thr Phe Ile His Leu Val Ile Glu	
65 70 75 80	
ggc tgg ttc tct ctc tac aat ggc atc ctt tta gaa gac caa gcc ttc	288
Gly Trp Phe Ser Leu Tyr Asn Gly Ile Leu Leu Glu Asp Gln Ala Phe	
85 90 95	
tta tcc caa ctc tgg aaa gag tat tcc aag gga gat agc cga tat atc	336
Leu Ser Gln Leu Trp Lys Glu Tyr Ser Lys Gly Asp Ser Arg Tyr Ile	
100 105 110	
ctt agt gac agc ttc gtc gtc tgt atg gag act gtc aca gct tgt ctc	384
Leu Ser Asp Ser Phe Val Val Cys Met Glu Thr Val Thr Ala Cys Leu	

115					120					125						
tgg	gga	cca	ctc	agc	cta	tgg	gta	gtg	att	gcc	ttt	ctc	cgc	caa	cag	432
Trp	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Trp	Val	Val	Ile	Ala	Phe	Leu	Arg	Gln	Gln	
130					135					140						
ccc	ttc	cgc	ttt	gtc	cta	cag	ctt	gtg	gtg	tct	atg	ggc	cag	ata	tac	480
Pro	Phe	Arg	Phe	Val	Leu	Gln	Leu	Val	Val	Ser	Met	Gly	Gln	Ile	Tyr	
145					150					155					160	
ggg	gat	gtg	ctg	tac	ttc	ctg	aca	gag	cta	cac	gaa	gga	ctc	cag	cat	528
Gly	Asp	Val	Leu	Tyr	Phe	Leu	Thr	Glu	Leu	His	Glu	Gly	Leu	Gln	His	
165					170					175						
ggg	gag	ata	ggc	cac	ccc	gtt	tat	ttc	tgg	ttc	tat	ttt	gtt	ttc	ctg	576
Gly	Glu	Ile	Gly	His	Pro	Val	Tyr	Phe	Trp	Phe	Tyr	Phe	Val	Phe	Leu	
180					185					190						
aat	gct	gta	tgg	ttg	gtg	ata	cca	agc	atc	ctt	gtg	ctt	gat	gcc	ata	624
Asn	Ala	Val	Trp	Leu	Val	Ile	Pro	Ser	Ile	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Ile	
195					200					205						
aag	cat	ctc	act	agt	gcc	cag	agc	gtg	ctg	gac	agc	aaa	gtc	atg	aaa	672
Lys	His	Leu	Thr	Ser	Ala	Gln	Ser	Val	Leu	Asp	Ser	Lys	Val	Met	Lys	
210					215					220						
att	aag	agc	aag	cat	aac	taa										693
Ile	Lys	Ser	Lys	His	Asn											
225					230											

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 230

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 2

Met	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Pro	Leu	His	Pro	Tyr	Trp	Pro	Arg	His	Leu	
1				5					10					15		
Lys	Leu	Asp	Asn	Phe	Val	Pro	Asn	Asp	Leu	Pro	Thr	Ser	His	Ile	Leu	
			20					25					30			
Val	Gly	Leu	Phe	Ser	Ile	Ser	Gly	Gly	Leu	Ile	Val	Ile	Thr	Trp	Leu	
		35					40					45				
Leu	Ser	Ser	Arg	Ala	Ser	Val	Val	Pro	Leu	Gly	Ala	Gly	Arg	Arg	Leu	
		50				55					60					
Ala	Leu	Cys	Trp	Phe	Ala	Val	Cys	Thr	Phe	Ile	His	Leu	Val	Ile	Glu	
		65			70					75					80	
Gly	Trp	Phe	Ser	Leu	Tyr	Asn	Gly	Ile	Leu	Leu	Glu	Asp	Gln	Ala	Phe	
				85					90					95		
Leu	Ser	Gln	Leu	Trp	Lys	Glu	Tyr	Ser	Lys	Gly	Asp	Ser	Arg	Tyr	Ile	
			100					105					110			

Leu Ser Asp Ser Phe Val Val Cys Met Glu Thr Val Thr Ala Cys Leu  
 115 120 125  
 Trp Gly Pro Leu Ser Leu Trp Val Val Ile Ala Phe Leu Arg Gln Gln  
 130 135 140  
 Pro Phe Arg Phe Val Leu Gln Leu Val Val Ser Met Gly Gln Ile Tyr  
 145 150 155 160  
 Gly Asp Val Leu Tyr Phe Leu Thr Glu Leu His Glu Gly Leu Gln His  
 165 170 175  
 Gly Glu Ile Gly His Pro Val Tyr Phe Trp Phe Tyr Phe Val Phe Leu  
 180 185 190  
 Asn Ala Val Trp Leu Val Ile Pro Ser Ile Leu Val Leu Asp Ala Ile  
 195 200 205  
 Lys His Leu Thr Ser Ala Gln Ser Val Leu Asp Ser Lys Val Met Lys  
 210 215 220  
 Ile Lys Ser Lys His Asn  
 225 230

<210> 3  
 <211> 693  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(693)

<400> 3  
 atg act acc aac gcg ggc ccc ttg cac cca tac tgg cct cag cac cta 48  
 Met Thr Thr Asn Ala Gly Pro Leu His Pro Tyr Trp Pro Gln His Leu  
 1 5 10 15  
 aga ctg gac aac ttt gta cct aat gac cgc ccc acc tgg cat ata ctg 96  
 Arg Leu Asp Asn Phe Val Pro Asn Asp Arg Pro Thr Trp His Ile Leu  
 20 25 30  
 gct ggc ctc ttc tct gtc aca ggg gtc tta gtc gtg acc aca tgg ctg 144  
 Ala Gly Leu Phe Ser Val Thr Gly Val Leu Val Val Thr Thr Trp Leu  
 35 40 45  
 ttg tca ggt cgt gct gcg gtt gtc cca ttg ggg act tgg cgg cga ctg 192  
 Leu Ser Gly Arg Ala Ala Val Val Pro Leu Gly Thr Trp Arg Arg Leu  
 50 55 60  
 tcc ctg tgc tgg ttt gca gtg tgt ggg ttc att cac ctg gtg atc gag 240  
 Ser Leu Cys Trp Phe Ala Val Cys Gly Phe Ile His Leu Val Ile Glu  
 65 70 75 80  
 ggc tgg ttc gtt ctc tac tac gaa gac ctg ctt gga gac caa gcc ttc 288

Gly	Trp	Phe	Val	Leu	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Leu	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Phe	
				85					90					95		
tta	tct	caa	ctc	tgg	aaa	gag	tat	gcc	aag	gga	gac	agc	cga	tac	atc	336
Leu	Ser	Gln	Leu	Trp	Lys	Glu	Tyr	Ala	Lys	Gly	Asp	Ser	Arg	Tyr	Ile	
			100					105					110			
ctg	ggt	gac	aac	ttc	aca	gtg	tgc	atg	gaa	acc	atc	aca	gct	tgc	ctg	384
Leu	Gly	Asp	Asn	Phe	Thr	Val	Cys	Met	Glu	Thr	Ile	Thr	Ala	Cys	Leu	
			115				120					125				
tgg	gga	cca	ctc	agc	ctg	tgg	gtg	gtg	atc	gcc	ttt	ctc	cgc	cag	cat	432
Trp	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Trp	Val	Val	Ile	Ala	Phe	Leu	Arg	Gln	His	
	130					135					140					
ccc	ctc	cgc	ttc	att	cta	cag	ctt	gtg	gtc	tct	gtg	ggc	cag	atc	tat	480
Pro	Leu	Arg	Phe	Ile	Leu	Gln	Leu	Val	Val	Ser	Val	Gly	Gln	Ile	Tyr	
145					150					155					160	
ggg	gat	gtg	ctc	tac	ttc	ctg	aca	gag	cac	cgc	gac	gga	ttc	cag	cac	528
Gly	Asp	Val	Leu	Tyr	Phe	Leu	Thr	Glu	His	Arg	Asp	Gly	Phe	Gln	His	
				165					170					175		
gga	gag	ctg	ggc	cac	cct	ctc	tac	ttc	tgg	ttt	tac	ttt	gtc	ttc	atg	576
Gly	Glu	Leu	Gly	His	Pro	Leu	Tyr	Phe	Trp	Phe	Tyr	Phe	Val	Phe	Met	
			180					185					190			
aat	gcc	ctg	tgg	ctg	gtg	ctg	cct	gga	gtc	ctt	gtg	ctt	gat	gct	gtg	624
Asn	Ala	Leu	Trp	Leu	Val	Leu	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Val	
			195				200					205				
aag	cac	ctc	act	cat	gcc	cag	agc	acg	ctg	gat	gcc	aag	gcc	aca	aaa	672
Lys	His	Leu	Thr	His	Ala	Gln	Ser	Thr	Leu	Asp	Ala	Lys	Ala	Thr	Lys	
			210			215					220					
gcc	aag	agc	aag	aag	aac	tga										693
Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Asn											
225					230											

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 230

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met	Thr	Thr	Asn	Ala	Gly	Pro	Leu	His	Pro	Tyr	Trp	Pro	Gln	His	Leu	
1				5					10					15		

Arg	Leu	Asp	Asn	Phe	Val	Pro	Asn	Asp	Arg	Pro	Thr	Trp	His	Ile	Leu	
			20					25					30			

Ala	Gly	Leu	Phe	Ser	Val	Thr	Gly	Val	Leu	Val	Val	Thr	Thr	Trp	Leu	
		35					40					45				

Leu	Ser	Gly	Arg	Ala	Ala	Val	Val	Pro	Leu	Gly	Thr	Trp	Arg	Arg	Leu	
	50					55					60					



Ser Leu Cys Trp Phe Ala Val Cys Gly Phe Ile His Leu Val Ile Glu  
 65 70 75 80  
 Gly Trp Phe Val Leu Tyr Tyr Glu Asp Leu Leu Gly Asp Gln Ala Phe  
 85 90 95  
 Leu Ser Gln Leu Trp Lys Glu Tyr Ala Lys Gly Asp Ser Arg Tyr Ile  
 100 105 110  
 Leu Gly Asp Asn Phe Thr Val Cys Met Glu Thr Ile Thr Ala Cys Leu  
 115 120 125  
 Trp Gly Pro Leu Ser Leu Trp Val Val Ile Ala Phe Leu Arg Gln His  
 130 135 140  
 Pro Leu Arg Phe Ile Leu Gln Leu Val Val Ser Val Gly Gln Ile Tyr  
 145 150 155 160  
 Gly Asp Val Leu Tyr Phe Leu Thr Glu His Arg Asp Gly Phe Gln His  
 165 170 175  
 Gly Glu Leu Gly His Pro Leu Tyr Phe Trp Phe Tyr Phe Val Phe Met  
 180 185 190  
 Asn Ala Leu Trp Leu Val Leu Pro Gly Val Leu Val Leu Asp Ala Val  
 195 200 205  
 Lys His Leu Thr His Ala Gln Ser Thr Leu Asp Ala Lys Ala Thr Lys  
 210 215 220  
 Ala Lys Ser Lys Lys Asn  
 225 230  
 <210> 5  
 <211> 669  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(669)  
 <400> 5  
 atg aag ttt ttc cca ctc ctt ttg ttg att ggt gtt gta ggc tac att 48  
 Met Lys Phe Phe Pro Leu Leu Leu Leu Ile Gly Val Val Gly Tyr Ile  
 1 5 10 15  
 atg aac gta ttg ttc act acc tgg ttg cca acc aat tac atg ttc gat 96  
 Met Asn Val Leu Phe Thr Thr Trp Leu Pro Thr Asn Tyr Met Phe Asp  
 20 25 30  
 cca aaa act ttg aac gaa ata tgt aac tcg gtg att agc aaa cac aac 144  
 Pro Lys Thr Leu Asn Glu Ile Cys Asn Ser Val Ile Ser Lys His Asn  
 35 40 45

```

gca gca gaa ggt tta tcc act gaa gac ctg tta cag gat gtc aga gac 192
Ala Ala Glu Gly Leu Ser Thr Glu Asp Leu Leu Gln Asp Val Arg Asp
    50                      55                      60

gca ctt gcc tct cat tac ggg gac gaa tac atc aac agg tac gtc aaa 240
Ala Leu Ala Ser His Tyr Gly Asp Glu Tyr Ile Asn Arg Tyr Val Lys
    65                      70                      75                      80

gaa gaa tgg gtc ttc aac aat gct ggt ggt gcg atg ggc caa atg atc 288
Glu Glu Trp Val Phe Asn Asn Ala Gly Gly Ala Met Gly Gln Met Ile
                      85                      90                      95

atc cta cac gct tcc gta tcc gag tac tta att cta ttc gga acc gct 336
Ile Leu His Ala Ser Val Ser Glu Tyr Leu Ile Leu Phe Gly Thr Ala
                      100                      105                      110

gtt ggt act gaa ggg cac aca ggt gtt cac ttt gct gac gac tat ttt 384
Val Gly Thr Glu Gly His Thr Gly Val His Phe Ala Asp Asp Tyr Phe
                      115                      120                      125

acc atc tta cat ggt acg caa atc gca gca ttg cca tat gcc act gaa 432
Thr Ile Leu His Gly Thr Gln Ile Ala Ala Leu Pro Tyr Ala Thr Glu
                      130                      135                      140

gcc gaa gtt tac act cct ggt atg act cat cac ttg aag aag gga tac 480
Ala Glu Val Tyr Thr Pro Gly Met Thr His His Leu Lys Lys Gly Tyr
                      145                      150                      155                      160

gcc aag caa tac agc atg cca ggt ggt tcc ttt gcc ctt gaa ttg gct 528
Ala Lys Gln Tyr Ser Met Pro Gly Gly Ser Phe Ala Leu Glu Leu Ala
                      165                      170                      175

caa ggc tgg att cca tgt atg ttg cca ttc ggg ttt ttg gac act ttc 576
Gln Gly Trp Ile Pro Cys Met Leu Pro Phe Gly Phe Leu Asp Thr Phe
                      180                      185                      190

tcc agt act ctt gat tta tac act cta tat aga act gtc tac ctg act 624
Ser Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Thr Leu Tyr Arg Thr Val Tyr Leu Thr
                      195                      200                      205

gcc agg gac atg ggt aag aac ttg ttg caa aac aaa aag ttc taa 669
Ala Arg Asp Met Gly Lys Asn Leu Leu Gln Asn Lys Lys Phe
                      210                      215                      220

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 222

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 6

```

Met Lys Phe Phe Pro Leu Leu Leu Leu Ile Gly Val Val Gly Tyr Ile
    1                      5                      10                      15

Met Asn Val Leu Phe Thr Thr Trp Leu Pro Thr Asn Tyr Met Phe Asp
                      20                      25                      30

```

Pro Lys Thr Leu Asn Glu Ile Cys Asn Ser Val Ile Ser Lys His Asn  
                   35                                  40                                  45  
 Ala Ala Glu Gly Leu Ser Thr Glu Asp Leu Leu Gln Asp Val Arg Asp  
           50                                  55                                  60  
 Ala Leu Ala Ser His Tyr Gly Asp Glu Tyr Ile Asn Arg Tyr Val Lys  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Glu Glu Trp Val Phe Asn Asn Ala Gly Gly Ala Met Gly Gln Met Ile  
                                   85                                  90                                  95  
 Ile Leu His Ala Ser Val Ser Glu Tyr Leu Ile Leu Phe Gly Thr Ala  
                                   100                                  105                                  110  
 Val Gly Thr Glu Gly His Thr Gly Val His Phe Ala Asp Asp Tyr Phe  
                   115                                  120                                  125  
 Thr Ile Leu His Gly Thr Gln Ile Ala Ala Leu Pro Tyr Ala Thr Glu  
   130                                  135                                  140  
 Ala Glu Val Tyr Thr Pro Gly Met Thr His His Leu Lys Lys Gly Tyr  
   145                                  150                                  155                                  160  
 Ala Lys Gln Tyr Ser Met Pro Gly Gly Ser Phe Ala Leu Glu Leu Ala  
                                   165                                  170                                  175  
 Gln Gly Trp Ile Pro Cys Met Leu Pro Phe Gly Phe Leu Asp Thr Phe  
                   180                                  185                                  190  
 Ser Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Thr Leu Tyr Arg Thr Val Tyr Leu Thr  
                   195                                  200                                  205  
 Ala Arg Asp Met Gly Lys Asn Leu Leu Gln Asn Lys Lys Phe  
   210                                  215                                  220

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 900

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(900)

&lt;400&gt; 7

atg gac ctg gtt ctc agt gcc gcc gat tac tac ttc ttc act ccg tat 48  
 Met Asp Leu Val Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Tyr Phe Phe Thr Pro Tyr  
   1                                  5                                  10                                  15  
 gta tat cca gcc acg tgg ccc gag gac aac atc atc cga caa act att 96  
 Val Tyr Pro Ala Thr Trp Pro Glu Asp Asn Ile Ile Arg Gln Thr Ile  
                   20                                  25                                  30  
 agc ctc ctg att gtc aca aac ctg ggt gct tac att ctc tac ttc ttc 144  
 Ser Leu Leu Ile Val Thr Asn Leu Gly Ala Tyr Ile Leu Tyr Phe Phe

35					40					45						
tgt	gca	acc	ctc	agc	tat	tat	ttt	gtc	tat	gat	cat	tcc	tta	atg	aaa	192
Cys	Ala	Thr	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Val	Tyr	Asp	His	Ser	Leu	Met	Lys	
	50						55				60					
cac	cca	cag	ttt	tta	aag	aac	caa	gtc	tcg	cgt	gag	atc	gtg	ttc	act	240
His	Pro	Gln	Phe	Leu	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Arg	Glu	Ile	Val	Phe	Thr	
	65				70					75					80	
gtc	aag	tct	ttg	cct	tgg	atc	agc	atc	ccc	acc	gtc	tca	cta	ttc	ctg	288
Val	Lys	Ser	Leu	Pro	Trp	Ile	Ser	Ile	Pro	Thr	Val	Ser	Leu	Phe	Leu	
				85					90					95		
ctg	gag	ctg	agg	ggg	tac	agc	aaa	ctc	tac	gat	gac	atc	gga	gac	ttt	336
Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Tyr	Ser	Lys	Leu	Tyr	Asp	Asp	Ile	Gly	Asp	Phe	
			100					105					110			
cca	aat	ggc	tgg	att	cat	ctc	atg	gtt	agc	gtc	gta	tcc	ttc	ctc	ttt	384
Pro	Asn	Gly	Trp	Ile	His	Leu	Met	Val	Ser	Val	Val	Ser	Phe	Leu	Phe	
		115					120					125				
ttc	aca	gac	atg	ttg	atc	tac	agg	att	cat	agg	ggc	ctg	cac	cac	aga	432
Phe	Thr	Asp	Met	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ile	His	Arg	Gly	Leu	His	His	Arg	
	130					135					140					
ctg	gtc	tac	aag	cgc	ata	cat	aaa	cca	cat	cat	att	tgg	aag	atc	ccc	480
Leu	Val	Tyr	Lys	Arg	Ile	His	Lys	Pro	His	His	Ile	Trp	Lys	Ile	Pro	
	145				150					155					160	
acg	ccg	ttt	gca	agt	cat	gct	ttt	cac	cct	gtg	gac	ggc	ttc	ctt	cag	528
Thr	Pro	Phe	Ala	Ser	His	Ala	Phe	His	Pro	Val	Asp	Gly	Phe	Leu	Gln	
				165					170					175		
agt	ctg	cct	tac	cat	ata	tac	ccc	ttt	gtc	ttt	cca	ctg	cac	aag	gtg	576
Ser	Leu	Pro	Tyr	His	Ile	Tyr	Pro	Phe	Val	Phe	Pro	Leu	His	Lys	Val	
			180					185					190			
gtc	tac	tta	ggg	tta	tat	gtc	ttg	gtt	aat	gtc	tgg	aca	att	tct	att	624
Val	Tyr	Leu	Gly	Leu	Tyr	Val	Leu	Val	Asn	Val	Trp	Thr	Ile	Ser	Ile	
		195					200					205				
cat	gat	ggg	gat	ttt	cgg	gtt	ccc	cag	atc	tta	agg	cca	ttt	att	aac	672
His	Asp	Gly	Asp	Phe	Arg	Val	Pro	Gln	Ile	Leu	Arg	Pro	Phe	Ile	Asn	
	210					215					220					
ggg	tca	gct	cac	cac	aca	gac	cac	cac	atg	ttc	ttt	gac	tat	aac	tat	720
Gly	Ser	Ala	His	His	Thr	Asp	His	His	Met	Phe	Phe	Asp	Tyr	Asn	Tyr	
	225				230					235					240	
gga	cag	tat	ttc	aca	ttg	tgg	gat	aga	att	gga	ggc	tct	ttt	aaa	cat	768
Gly	Gln	Tyr	Phe	Thr	Leu	Trp	Asp	Arg	Ile	Gly	Gly	Ser	Phe	Lys	His	
				245				250						255		
cct	tcc	tct	ttt	gaa	ggg	aaa	gga	cca	cat	agt	tac	gtg	aag	aac	atg	816
Pro	Ser	Ser	Phe	Glu	Gly	Lys	Gly	Pro	His	Ser	Tyr	Val	Lys	Asn	Met	
			260					265					270			

aca gaa aaa gaa tct aac agc ttt gca gaa aac ggc tgt aaa ggc aaa 864  
 Thr Glu Lys Glu Ser Asn Ser Phe Ala Glu Asn Gly Cys Lys Gly Lys  
           275                                  280                                  285

aaa gta agc aat gga gag ttt aca aag aat aag tag 900  
 Lys Val Ser Asn Gly Glu Phe Thr Lys Asn Lys  
           290                                  295                                  300

<210> 8  
 <211> 299  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 8  
 Met Asp Leu Val Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Tyr Phe Phe Thr Pro Tyr  
       1                                  5                                  10                                  15

Val Tyr Pro Ala Thr Trp Pro Glu Asp Asn Ile Ile Arg Gln Thr Ile  
                                   20                                  25                                  30

Ser Leu Leu Ile Val Thr Asn Leu Gly Ala Tyr Ile Leu Tyr Phe Phe  
                                   35                                  40                                  45

Cys Ala Thr Leu Ser Tyr Tyr Phe Val Tyr Asp His Ser Leu Met Lys  
                                   50                                  55                                  60

His Pro Gln Phe Leu Lys Asn Gln Val Ser Arg Glu Ile Val Phe Thr  
       65                                  70                                  75                                  80

Val Lys Ser Leu Pro Trp Ile Ser Ile Pro Thr Val Ser Leu Phe Leu  
                                   85                                  90                                  95

Leu Glu Leu Arg Gly Tyr Ser Lys Leu Tyr Asp Asp Ile Gly Asp Phe  
                                   100                                  105                                  110

Pro Asn Gly Trp Ile His Leu Met Val Ser Val Val Ser Phe Leu Phe  
                                   115                                  120                                  125

Phe Thr Asp Met Leu Ile Tyr Arg Ile His Arg Gly Leu His His Arg  
       130                                  135                                  140

Leu Val Tyr Lys Arg Ile His Lys Pro His His Ile Trp Lys Ile Pro  
       145                                  150                                  155                                  160

Thr Pro Phe Ala Ser His Ala Phe His Pro Val Asp Gly Phe Leu Gln  
                                   165                                  170                                  175

Ser Leu Pro Tyr His Ile Tyr Pro Phe Val Phe Pro Leu His Lys Val  
                                   180                                  185                                  190

Val Tyr Leu Gly Leu Tyr Val Leu Val Asn Val Trp Thr Ile Ser Ile  
       195                                  200                                  205

His Asp Gly Asp Phe Arg Val Pro Gln Ile Leu Arg Pro Phe Ile Asn  
       210                                  215                                  220

Gly Ser Ala His His Thr Asp His His Met Phe Phe Asp Tyr Asn Tyr  
 225 230 235 240  
 Gly Gln Tyr Phe Thr Leu Trp Asp Arg Ile Gly Gly Ser Phe Lys His  
 245 250 255  
 Pro Ser Ser Phe Glu Gly Lys Gly Pro His Ser Tyr Val Lys Asn Met  
 260 265 270  
 Thr Glu Lys Glu Ser Asn Ser Phe Ala Glu Asn Gly Cys Lys Gly Lys  
 275 280 285  
 Lys Val Ser Asn Gly Glu Phe Thr Lys Asn Lys  
 290 295

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 900

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(900)

&lt;400&gt; 9

atg gat ctt gta ctc cgt gtt gca gat tac tat ttt ttt aca cca tac 48  
 Met Asp Leu Val Leu Arg Val Ala Asp Tyr Tyr Phe Phe Thr Pro Tyr  
 1 5 10 15  
 gtg tat cca gcc aca tgg cca gaa gat gac atc ttc cga caa gct att 96  
 Val Tyr Pro Ala Thr Trp Pro Glu Asp Asp Ile Phe Arg Gln Ala Ile  
 20 25 30  
 agt ctt ctg att gta aca aat gtt ggt gct tac atc ctt tat ttc ttc 144  
 Ser Leu Leu Ile Val Thr Asn Val Gly Ala Tyr Ile Leu Tyr Phe Phe  
 35 40 45  
 tgt gca aca ctg agc tat tat ttt gtc ttc gat cat gca tta atg aaa 192  
 Cys Ala Thr Leu Ser Tyr Tyr Phe Val Phe Asp His Ala Leu Met Lys  
 50 55 60  
 cat cca caa ttt tta aag aat caa gtc cgt cga gag att aag ttt act 240  
 His Pro Gln Phe Leu Lys Asn Gln Val Arg Arg Glu Ile Lys Phe Thr  
 65 70 75 80  
 gtc cag gca ttg cca tgg ata agt att ctt act gtt gca ctg ttc ttg 288  
 Val Gln Ala Leu Pro Trp Ile Ser Ile Leu Thr Val Ala Leu Phe Leu  
 85 90 95  
 ctg gag ata aga ggt tac agc aaa tta cat gat gac cta gga gag ttt 336  
 Leu Glu Ile Arg Gly Tyr Ser Lys Leu His Asp Asp Leu Gly Glu Phe  
 100 105 110  
 cca tat gga ttg ttt gaa ctt gtc gtt agt ata ata tct ttc ctc ttt 384  
 Pro Tyr Gly Leu Phe Glu Leu Val Val Ser Ile Ile Ser Phe Leu Phe

115	120	125	
ttc act gac atg ttc atc tac tgg att cac aga ggc ctt cat cat aga			432
Phe Thr Asp Met Phe Ile Tyr Trp Ile His Arg Gly Leu His His Arg			
130	135	140	
ctg gta tat aag cgc cta cat aaa cct cac cat att tgg aag att cct			480
Leu Val Tyr Lys Arg Leu His Lys Pro His His Ile Trp Lys Ile Pro			
145	150	155	160
act cca ttt gca agt cat gct ttt cac cct att gat ggc ttt ctt cag			528
Thr Pro Phe Ala Ser His Ala Phe His Pro Ile Asp Gly Phe Leu Gln			
	165	170	175
agt cta cct tac cat ata tac cct ttt atc ttt cca tta cac aag gtg			576
Ser Leu Pro Tyr His Ile Tyr Pro Phe Ile Phe Pro Leu His Lys Val			
	180	185	190
gtt tat tta agt ctg tac atc ttg gtt aat atc tgg aca att tcc att			624
Val Tyr Leu Ser Leu Tyr Ile Leu Val Asn Ile Trp Thr Ile Ser Ile			
	195	200	205
cat gac ggt gat ttt cgt gtc ccc caa atc tta cag cca ttt att aat			672
His Asp Gly Asp Phe Arg Val Pro Gln Ile Leu Gln Pro Phe Ile Asn			
	210	215	220
ggc tca gct cat cat aca gac cac cat atg ttc ttt gac tat aat tat			720
Gly Ser Ala His His Thr Asp His His Met Phe Phe Asp Tyr Asn Tyr			
225	230	235	240
gga caa tat ttc act ttg tgg gat agg att ggc ggc tca ttc aaa aat			768
Gly Gln Tyr Phe Thr Leu Trp Asp Arg Ile Gly Gly Ser Phe Lys Asn			
	245	250	255
cct tca tcc ttt gag ggg aag gga ccg ctc agt tat gtg aag gag atg			816
Pro Ser Ser Phe Glu Gly Lys Gly Pro Leu Ser Tyr Val Lys Glu Met			
	260	265	270
aca gag gga aag cgc agc agc cct tca gga aat ggc tgt aag aat gaa			864
Thr Glu Gly Lys Arg Ser Ser Pro Ser Gly Asn Gly Cys Lys Asn Glu			
	275	280	285
aaa tta ttc aat gga gag ttt aca aag act gaa tag			900
Lys Leu Phe Asn Gly Glu Phe Thr Lys Thr Glu			
	290	295	300

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 299

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

Met	Asp	Leu	Val	Leu	Arg	Val	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Thr	Pro	Tyr
1				5				10						15	

Val Tyr Pro Ala Thr Trp Pro Glu Asp Asp Ile Phe Arg Gln Ala Ile

20					25					30					
Ser	Leu	Leu	Ile	Val	Thr	Asn	Val	Gly	Ala	Tyr	Ile	Leu	Tyr	Phe	Phe
		35					40					45			
Cys	Ala	Thr	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Val	Phe	Asp	His	Ala	Leu	Met	Lys
	50					55					60				
His	Pro	Gln	Phe	Leu	Lys	Asn	Gln	Val	Arg	Arg	Glu	Ile	Lys	Phe	Thr
	65					70					75				80
Val	Gln	Ala	Leu	Pro	Trp	Ile	Ser	Ile	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	Phe	Leu
				85					90					95	
Leu	Glu	Ile	Arg	Gly	Tyr	Ser	Lys	Leu	His	Asp	Asp	Leu	Gly	Glu	Phe
			100					105					110		
Pro	Tyr	Gly	Leu	Phe	Glu	Leu	Val	Val	Ser	Ile	Ile	Ser	Phe	Leu	Phe
		115					120					125			
Phe	Thr	Asp	Met	Phe	Ile	Tyr	Trp	Ile	His	Arg	Gly	Leu	His	His	Arg
	130					135					140				
Leu	Val	Tyr	Lys	Arg	Leu	His	Lys	Pro	His	His	Ile	Trp	Lys	Ile	Pro
	145					150					155				160
Thr	Pro	Phe	Ala	Ser	His	Ala	Phe	His	Pro	Ile	Asp	Gly	Phe	Leu	Gln
				165					170					175	
Ser	Leu	Pro	Tyr	His	Ile	Tyr	Pro	Phe	Ile	Phe	Pro	Leu	His	Lys	Val
			180					185					190		
Val	Tyr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ile	Leu	Val	Asn	Ile	Trp	Thr	Ile	Ser	Ile
		195					200					205			
His	Asp	Gly	Asp	Phe	Arg	Val	Pro	Gln	Ile	Leu	Gln	Pro	Phe	Ile	Asn
	210					215					220				
Gly	Ser	Ala	His	His	Thr	Asp	His	His	Met	Phe	Phe	Asp	Tyr	Asn	Tyr
	225					230					235				240
Gly	Gln	Tyr	Phe	Thr	Leu	Trp	Asp	Arg	Ile	Gly	Gly	Ser	Phe	Lys	Asn
				245					250					255	
Pro	Ser	Ser	Phe	Glu	Gly	Lys	Gly	Pro	Leu	Ser	Tyr	Val	Lys	Glu	Met
			260					265					270		
Thr	Glu	Gly	Lys	Arg	Ser	Ser	Pro	Ser	Gly	Asn	Gly	Cys	Lys	Asn	Glu
		275					280					285			
Lys	Leu	Phe	Asn	Gly	Glu	Phe	Thr	Lys	Thr	Glu					
						295									

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1098

&lt;212&gt; DNA



<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1098)

&lt;400&gt; 11

atg gat ttg gtc tta gaa gtc gct gac cat tat gtc tta gac gac ttg	48
Met Asp Leu Val Leu Glu Val Ala Asp His Tyr Val Leu Asp Asp Leu	
1 5 10 15	
tac gct aaa gtt ctg ccc gct tcg ttg gca gct aat att cct gtc aag	96
Tyr Ala Lys Val Leu Pro Ala Ser Leu Ala Ala Asn Ile Pro Val Lys	
20 25 30	
tgg cag aaa ttg cta ggg ttg aac agt ggg ttc agc aat tct acg att	144
Trp Gln Lys Leu Leu Gly Leu Asn Ser Gly Phe Ser Asn Ser Thr Ile	
35 40 45	
ttg cag gag act ttg aac tcc aag aat gcc gtc aaa gaa tgt aga agg	192
Leu Gln Glu Thr Leu Asn Ser Lys Asn Ala Val Lys Glu Cys Arg Arg	
50 55 60	
ttc tac ggg cag gtg cca ttc ctg ttt gat atg tcg acg acg tct ttt	240
Phe Tyr Gly Gln Val Pro Phe Leu Phe Asp Met Ser Thr Thr Ser Phe	
65 70 75 80	
gca tcg cta ttg cct cgt tcc agc atc ttg aga gaa ttc ctc tca cta	288
Ala Ser Leu Leu Pro Arg Ser Ser Ile Leu Arg Glu Phe Leu Ser Leu	
85 90 95	
tgg gtt att gtt acg atc ttt ggt tta cta ctt tac tta ttc acg gct	336
Trp Val Ile Val Thr Ile Phe Gly Leu Leu Leu Tyr Leu Phe Thr Ala	
100 105 110	
agt ctc agc tac gtg ttt gtg ttt gac aag tcg att ttc aac cat cct	384
Ser Leu Ser Tyr Val Phe Val Phe Asp Lys Ser Ile Phe Asn His Pro	
115 120 125	
cgt tac ttg aaa aac caa atg gca atg gaa atc aag ttg gca gtc agt	432
Arg Tyr Leu Lys Asn Gln Met Ala Met Glu Ile Lys Leu Ala Val Ser	
130 135 140	
gct atc cca tgg atg tcg atg ttg acc gtt cca tgg ttt gtt atg gaa	480
Ala Ile Pro Trp Met Ser Met Leu Thr Val Pro Trp Phe Val Met Glu	
145 150 155 160	
ttg aac ggc cat tct aaa cta tac atg aag att gat tat gaa aac cac	528
Leu Asn Gly His Ser Lys Leu Tyr Met Lys Ile Asp Tyr Glu Asn His	
165 170 175	
ggt gta agg aag ctc att atc gag tac ttc act ttc atc ttt ttc act	576
Gly Val Arg Lys Leu Ile Ile Glu Tyr Phe Thr Phe Ile Phe Phe Thr	
180 185 190	
gat tgc ggt gtg tat tta gcg cac aga tgg ttg cat tgg cca agg gtc	624
Asp Cys Gly Val Tyr Leu Ala His Arg Trp Leu His Trp Pro Arg Val	

195	200	205	
tac cgt gct ctg cac aag cct cat cac aag tgg ctg gtc tgc aca cct			672
Tyr Arg Ala Leu His Lys Pro His His Lys Trp Leu Val Cys Thr Pro			
210	215	220	
ttc gca tct cat tct ttc cat cct gta gac ggg ttt ttg caa tcc atc			720
Phe Ala Ser His Ser Phe His Pro Val Asp Gly Phe Leu Gln Ser Ile			
225	230	235	240
tcg tac cac atc tac cca ttg att ctg cca tta cac aag gtt tct tat			768
Ser Tyr His Ile Tyr Pro Leu Ile Leu Pro Leu His Lys Val Ser Tyr			
	245	250	255
ttg att ctg ttc act ttt gtt aac ttt tgg act gtt atg att cat gac			816
Leu Ile Leu Phe Thr Phe Val Asn Phe Trp Thr Val Met Ile His Asp			
	260	265	270
ggt caa tac cta tca aac aat cct gcc gtc aac ggt act gcc tgc cac			864
Gly Gln Tyr Leu Ser Asn Asn Pro Ala Val Asn Gly Thr Ala Cys His			
	275	280	285
acg gtt cac cat cta tat ttc aac tac aac tac ggt caa ttc acc act			912
Thr Val His His Leu Tyr Phe Asn Tyr Asn Tyr Gly Gln Phe Thr Thr			
	290	295	300
ctg tgg gac aga cta ggg ggt tct tac cgt aga cca gat gac tca ttg			960
Leu Trp Asp Arg Leu Gly Gly Ser Tyr Arg Arg Pro Asp Asp Ser Leu			
305	310	315	320
ttt gat cct aag tta aga gat gct aag gag acc tgg gac gct caa gtt			1008
Phe Asp Pro Lys Leu Arg Asp Ala Lys Glu Thr Trp Asp Ala Gln Val			
	325	330	335
aag gaa gtt gaa cat ttc atc aag gag gtc gaa ggt gat gat aat gat			1056
Lys Glu Val Glu His Phe Ile Lys Glu Val Glu Gly Asp Asp Asn Asp			
	340	345	350
aga atc tat gaa aac gac cca aat acc aag aag aac aac tga			1098
Arg Ile Tyr Glu Asn Asp Pro Asn Thr Lys Lys Asn Asn			
	355	360	365
<210> 12			
<211> 365			
<212> PRT			
<213> Saccharomyces cerevisiae			
<400> 12			
Met Asp Leu Val Leu Glu Val Ala Asp His Tyr Val Leu Asp Asp Leu			
1	5	10	15
Tyr Ala Lys Val Leu Pro Ala Ser Leu Ala Ala Asn Ile Pro Val Lys			
	20	25	30
Trp Gln Lys Leu Leu Gly Leu Asn Ser Gly Phe Ser Asn Ser Thr Ile			
	35	40	45

Leu Gln Glu Thr Leu Asn Ser Lys Asn Ala Val Lys Glu Cys Arg Arg  
 50 55 60  
 Phe Tyr Gly Gln Val Pro Phe Leu Phe Asp Met Ser Thr Thr Ser Phe  
 65 70 75 80  
 Ala Ser Leu Leu Pro Arg Ser Ser Ile Leu Arg Glu Phe Leu Ser Leu  
 85 90 95  
 Trp Val Ile Val Thr Ile Phe Gly Leu Leu Leu Tyr Leu Phe Thr Ala  
 100 105 110  
 Ser Leu Ser Tyr Val Phe Val Phe Asp Lys Ser Ile Phe Asn His Pro  
 115 120 125  
 Arg Tyr Leu Lys Asn Gln Met Ala Met Glu Ile Lys Leu Ala Val Ser  
 130 135 140  
 Ala Ile Pro Trp Met Ser Met Leu Thr Val Pro Trp Phe Val Met Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Gly His Ser Lys Leu Tyr Met Lys Ile Asp Tyr Glu Asn His  
 165 170 175  
 Gly Val Arg Lys Leu Ile Ile Glu Tyr Phe Thr Phe Ile Phe Phe Thr  
 180 185 190  
 Asp Cys Gly Val Tyr Leu Ala His Arg Trp Leu His Trp Pro Arg Val  
 195 200 205  
 Tyr Arg Ala Leu His Lys Pro His His Lys Trp Leu Val Cys Thr Pro  
 210 215 220  
 Phe Ala Ser His Ser Phe His Pro Val Asp Gly Phe Leu Gln Ser Ile  
 225 230 235 240  
 Ser Tyr His Ile Tyr Pro Leu Ile Leu Pro Leu His Lys Val Ser Tyr  
 245 250 255  
 Leu Ile Leu Phe Thr Phe Val Asn Phe Trp Thr Val Met Ile His Asp  
 260 265 270  
 Gly Gln Tyr Leu Ser Asn Asn Pro Ala Val Asn Gly Thr Ala Cys His  
 275 280 285  
 Thr Val His His Leu Tyr Phe Asn Tyr Asn Tyr Gly Gln Phe Thr Thr  
 290 295 300  
 Leu Trp Asp Arg Leu Gly Gly Ser Tyr Arg Arg Pro Asp Asp Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Phe Asp Pro Lys Leu Arg Asp Ala Lys Glu Thr Trp Asp Ala Gln Val  
 325 330 335  
 Lys Glu Val Glu His Phe Ile Lys Glu Val Glu Gly Asp Asp Asn Asp  
 340 345 350

Arg Ile Tyr Glu Asn Asp Pro Asn Thr Lys Lys Asn Asn  
 355 360 365

<210> 13  
 <211> 1557  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1557)

<400> 13  
 atg gag ccc gcc gtg tgc ctg gcc gtg tgc gcg ctg ctc ttt ctg ctc 48  
 Met Glu Pro Ala Val Ser Leu Ala Val Cys Ala Leu Leu Phe Leu Leu  
 1 5 10 15  
 tgg gtg cga gtg aag ggg ttg gag ttc gtt ctc atc cac cag cgc tgg 96  
 Trp Val Arg Val Lys Gly Leu Glu Phe Val Leu Ile His Gln Arg Trp  
 20 25 30  
 gtg ttc gtg tgc ctc ttc ttg ctg ccg ctc tgc ctc atc ttc gat atc 144  
 Val Phe Val Cys Leu Phe Leu Leu Pro Leu Ser Leu Ile Phe Asp Ile  
 35 40 45  
 tac tac tac gtg cgc gcc tgg gtg gtg ttc aag ctg agc agt gcg ccg 192  
 Tyr Tyr Tyr Val Arg Ala Trp Val Val Phe Lys Leu Ser Ser Ala Pro  
 50 55 60  
 cgc ctg cac gag cag cgc gtg cgg gac atc cag aaa cag gtc cgg gaa 240  
 Arg Leu His Glu Gln Arg Val Arg Asp Ile Gln Lys Gln Val Arg Glu  
 65 70 75 80  
 tgg aag gaa cag ggc agt aag acc ttc atg tgc acg ggg cgc cca ggc 288  
 Trp Lys Glu Gln Gly Ser Lys Thr Phe Met Cys Thr Gly Arg Pro Gly  
 85 90 95  
 tgg ctc act gtc tgc ctg cga gtc gga aag tac aag aag acc cat aag 336  
 Trp Leu Thr Val Ser Leu Arg Val Gly Lys Tyr Lys Lys Thr His Lys  
 100 105 110  
 aac atc atg atc aac ctg atg gac atc ctg gag gtg gac acc aag aaa 384  
 Asn Ile Met Ile Asn Leu Met Asp Ile Leu Glu Val Asp Thr Lys Lys  
 115 120 125  
 cag att gtt cga gtg gag ccc ttg gtg tct atg ggt cag gtg aca gct 432  
 Gln Ile Val Arg Val Glu Pro Leu Val Ser Met Gly Gln Val Thr Ala  
 130 135 140  
 ttg ctg aac tcc att ggc tgg acc ctg cct gtg ttg cct gag ctt gat 480  
 Leu Leu Asn Ser Ile Gly Trp Thr Leu Pro Val Leu Pro Glu Leu Asp  
 145 150 155 160  
 gac ctc aca gtg ggg ggc ctg atc atg ggc aca ggc atc gag tca tgc 528  
 Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Ile Met Gly Thr Gly Ile Glu Ser Ser

165					170					175						
tcc	cac	aag	tat	ggc	ctg	ttc	caa	cac	att	tgc	act	gcc	tac	gag	ctg	576
Ser	His	Lys	Tyr	Gly	Leu	Phe	Gln	His	Ile	Cys	Thr	Ala	Tyr	Glu	Leu	
			180						185				190			
atc	ctg	gca	gac	ggc	agc	ttt	gtg	cgc	tgc	aca	ccg	tct	gaa	aac	tca	624
Ile	Leu	Ala	Asp	Gly	Ser	Phe	Val	Arg	Cys	Thr	Pro	Ser	Glu	Asn	Ser	
		195					200					205				
gac	ctg	ttc	tat	gcc	gtg	ccc	tgg	tcc	tgt	ggg	acc	ctg	ggc	ttc	ctg	672
Asp	Leu	Phe	Tyr	Ala	Val	Pro	Trp	Ser	Cys	Gly	Thr	Leu	Gly	Phe	Leu	
	210					215					220					
gtg	gct	gcc	gag	atc	cgg	atc	atc	ccg	gcc	aag	aag	tat	gtc	aag	ctg	720
Val	Ala	Ala	Glu	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	Ala	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Leu	
225					230					235					240	
cgg	ttt	gag	cct	gtt	cgg	ggc	ctg	gag	gcc	atc	tgt	gaa	aaa	ttc	acc	768
Arg	Phe	Glu	Pro	Val	Arg	Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Cys	Glu	Lys	Phe	Thr	
				245					250					255		
cgc	gag	tcc	cag	cgg	ctg	gag	aac	cac	ttc	gtg	gaa	ggg	ttg	ctg	tac	816
Arg	Glu	Ser	Gln	Arg	Leu	Glu	Asn	His	Phe	Val	Glu	Gly	Leu	Leu	Tyr	
			260					265					270			
tcc	ctg	gat	gag	gct	gtg	gct	gtc	atc	atg	aca	ggg	gtc	atg	acg	gac	864
Ser	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Ala	Val	Ile	Met	Thr	Gly	Val	Met	Thr	Asp	
		275					280					285				
gac	gta	gag	tcc	agc	aag	ctg	aat	agc	att	ggc	agt	tac	tac	aag	ccc	912
Asp	Val	Glu	Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Ser	Ile	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Lys	Pro	
	290					295					300					
tgg	ttc	ttc	aag	cat	gtg	gag	aac	tac	ctg	aag	aca	aac	cgg	gag	ggc	960
Trp	Phe	Phe	Lys	His	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Lys	Thr	Asn	Arg	Glu	Gly	
305					310					315				320		
ctc	gaa	tac	att	ccc	ctg	aga	cac	tac	tac	cac	cga	cac	acg	cgc	agc	1008
Leu	Glu	Tyr	Ile	Pro	Leu	Arg	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Thr	Arg	Ser	
				325				330						335		
atc	ttc	tgg	gag	ctc	cag	gac	atc	atc	cct	ttc	ggc	aac	aac	ccc	atc	1056
Ile	Phe	Trp	Glu	Leu	Gln	Asp	Ile	Ile	Pro	Phe	Gly	Asn	Asn	Pro	Ile	
			340				345						350			
ttc	cgc	tac	ctc	ttc	ggc	tgg	atg	gtg	cct	ccc	aag	atc	tcc	ctc	ctg	1104
Phe	Arg	Tyr	Leu	Phe	Gly	Trp	Met	Val	Pro	Pro	Lys	Ile	Ser	Leu	Leu	
		355					360					365				
aag	ctg	acc	cag	ggc	gag	acg	cta	cgc	aag	ctg	tac	gag	cag	cac	cac	1152
Lys	Leu	Thr	Gln	Gly	Glu	Thr	Leu	Arg	Lys	Leu	Tyr	Glu	Gln	His	His	
	370					375					380					
gtg	gtg	cag	gac	atg	ctg	gtg	ccc	atg	aag	tgc	atg	tca	cag	gcc	ctg	1200
Val	Val	Gln	Asp	Met	Leu	Val	Pro	Met	Lys	Cys	Met	Ser	Gln	Ala	Leu	
385					390					395					400	

cat acc ttc caa aat gac atc cac gtc tac ccc atc tgg ctg tgc cca 1248  
 His Thr Phe Gln Asn Asp Ile His Val Tyr Pro Ile Trp Leu Cys Pro  
                     405                    410                    415

ttc atc ctg ccc agc cag cca gga cta gtg cat ccc aag gga gat gaa 1296  
 Phe Ile Leu Pro Ser Gln Pro Gly Leu Val His Pro Lys Gly Asp Glu  
                     420                    425                    430

gca gag ctc tac gtg gac atc ggg gca tac ggg gag cca cgt gtg aag 1344  
 Ala Glu Leu Tyr Val Asp Ile Gly Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Val Lys  
                     435                    440                    445

cac ttc gag gcc agg tcc tgc atg agg cag ctg gag aag ttt gtg cgg 1392  
 His Phe Glu Ala Arg Ser Cys Met Arg Gln Leu Glu Lys Phe Val Arg  
                     450                    455                    460

agt gtg cac ggg ttc caa atg tta tac gcc gat tgc tat atg aac cgc 1440  
 Ser Val His Gly Phe Gln Met Leu Tyr Ala Asp Cys Tyr Met Asn Arg  
                     465                    470                    475                    480

gag gaa ttc tgg gag atg ttc gat ggc tcc ttg tac cac aag ctg cgc 1488  
 Glu Glu Phe Trp Glu Met Phe Asp Gly Ser Leu Tyr His Lys Leu Arg  
                     485                    490                    495

aag cag ctg ggc tgc cag gac gcc ttc cct gag gtg tac gac aag atc 1536  
 Lys Gln Leu Gly Cys Gln Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile  
                     500                    505                    510

tgc aag gcg gca agg cac tga 1557  
 Cys Lys Ala Ala Arg His  
                     515

<210> 14  
 <211> 518  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 14  
 Met Glu Pro Ala Val Ser Leu Ala Val Cys Ala Leu Leu Phe Leu Leu  
   1                    5                    10                    15

Trp Val Arg Val Lys Gly Leu Glu Phe Val Leu Ile His Gln Arg Trp  
                     20                    25                    30

Val Phe Val Cys Leu Phe Leu Leu Pro Leu Ser Leu Ile Phe Asp Ile  
                     35                    40                    45

Tyr Tyr Tyr Val Arg Ala Trp Val Val Phe Lys Leu Ser Ser Ala Pro  
                     50                    55                    60

Arg Leu His Glu Gln Arg Val Arg Asp Ile Gln Lys Gln Val Arg Glu  
                     65                    70                    75                    80

Trp Lys Glu Gln Gly Ser Lys Thr Phe Met Cys Thr Gly Arg Pro Gly  
                     85                    90                    95

Trp Leu Thr Val Ser Leu Arg Val Gly Lys Tyr Lys Lys Thr His Lys  
 100 105 110  
 Asn Ile Met Ile Asn Leu Met Asp Ile Leu Glu Val Asp Thr Lys Lys  
 115 120 125  
 Gln Ile Val Arg Val Glu Pro Leu Val Ser Met Gly Gln Val Thr Ala  
 130 135 140  
 Leu Leu Asn Ser Ile Gly Trp Thr Leu Pro Val Leu Pro Glu Leu Asp  
 145 150 155 160  
 Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Ile Met Gly Thr Gly Ile Glu Ser Ser  
 165 170 175  
 Ser His Lys Tyr Gly Leu Phe Gln His Ile Cys Thr Ala Tyr Glu Leu  
 180 185 190  
 Ile Leu Ala Asp Gly Ser Phe Val Arg Cys Thr Pro Ser Glu Asn Ser  
 195 200 205  
 Asp Leu Phe Tyr Ala Val Pro Trp Ser Cys Gly Thr Leu Gly Phe Leu  
 210 215 220  
 Val Ala Ala Glu Ile Arg Ile Ile Pro Ala Lys Lys Tyr Val Lys Leu  
 225 230 235 240  
 Arg Phe Glu Pro Val Arg Gly Leu Glu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr  
 245 250 255  
 Arg Glu Ser Gln Arg Leu Glu Asn His Phe Val Glu Gly Leu Leu Tyr  
 260 265 270  
 Ser Leu Asp Glu Ala Val Ala Val Ile Met Thr Gly Val Met Thr Asp  
 275 280 285  
 Asp Val Glu Ser Ser Lys Leu Asn Ser Ile Gly Ser Tyr Tyr Lys Pro  
 290 295 300  
 Trp Phe Phe Lys His Val Glu Asn Tyr Leu Lys Thr Asn Arg Glu Gly  
 305 310 315 320  
 Leu Glu Tyr Ile Pro Leu Arg His Tyr Tyr His Arg His Thr Arg Ser  
 325 330 335  
 Ile Phe Trp Glu Leu Gln Asp Ile Ile Pro Phe Gly Asn Asn Pro Ile  
 340 345 350  
 Phe Arg Tyr Leu Phe Gly Trp Met Val Pro Pro Lys Ile Ser Leu Leu  
 355 360 365  
 Lys Leu Thr Gln Gly Glu Thr Leu Arg Lys Leu Tyr Glu Gln His His  
 370 375 380  
 Val Val Gln Asp Met Leu Val Pro Met Lys Cys Met Ser Gln Ala Leu  
 385 390 395 400

His Thr Phe Gln Asn Asp Ile His Val Tyr Pro Ile Trp Leu Cys Pro  
 405 410 415  
 Phe Ile Leu Pro Ser Gln Pro Gly Leu Val His Pro Lys Gly Asp Glu  
 420 425 430  
 Ala Glu Leu Tyr Val Asp Ile Gly Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Val Lys  
 435 440 445  
 His Phe Glu Ala Arg Ser Cys Met Arg Gln Leu Glu Lys Phe Val Arg  
 450 455 460  
 Ser Val His Gly Phe Gln Met Leu Tyr Ala Asp Cys Tyr Met Asn Arg  
 465 470 475 480  
 Glu Glu Phe Trp Glu Met Phe Asp Gly Ser Leu Tyr His Lys Leu Arg  
 485 490 495  
 Lys Gln Leu Gly Cys Gln Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile  
 500 505 510  
 Cys Lys Ala Ala Arg His  
 515

<210> 15  
 <211> 1551  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1551)

<400> 15  
 atg gag ccc gcc gtg tcg ctg gcc gtg tgc gcg ctg ctc ttc ctg ctg 48  
 Met Glu Pro Ala Val Ser Leu Ala Val Cys Ala Leu Leu Phe Leu Leu  
 1 5 10 15  
 tgg gtg cgc ctg aag ggg ctg gag ttc gtg ctc atc cac cag cgc tgg 96  
 Trp Val Arg Leu Lys Gly Leu Glu Phe Val Leu Ile His Gln Arg Trp  
 20 25 30  
 gtg ttc gtg tgc ctc ttc ctc ctg ccg ctc tcg ctt atc ttc gat atc 144  
 Val Phe Val Cys Leu Phe Leu Leu Pro Leu Ser Leu Ile Phe Asp Ile  
 35 40 45  
 tac tac tac gtg cgc gcc tgg gtg gtg ttc aag ctc agc agc gct ccg 192  
 Tyr Tyr Tyr Val Arg Ala Trp Val Val Phe Lys Leu Ser Ser Ala Pro  
 50 55 60  
 cgc ctg cac gag cag cgc gtg cgg gac atc cag aag cag gtg cgg gaa 240  
 Arg Leu His Glu Gln Arg Val Arg Asp Ile Gln Lys Gln Val Arg Glu  
 65 70 75 80  
 tgg aag gag cag ggt agc aag acc ttc atg tgc acg ggg cgc cct ggc 288



Trp	Lys	Glu	Gln	Gly	Ser	Lys	Thr	Phe	Met	Cys	Thr	Gly	Arg	Pro	Gly	
				85					90					95		
tgg	ctc	act	gtc	tca	cta	cgt	gtc	ggg	aag	tac	aag	aag	aca	cac	aaa	336
Trp	Leu	Thr	Val	Ser	Leu	Arg	Val	Gly	Lys	Tyr	Lys	Lys	Thr	His	Lys	
			100					105					110			
aac	atc	atg	atc	aac	ctg	atg	gac	att	ctg	gaa	gtg	gac	acc	aag	aaa	384
Asn	Ile	Met	Ile	Asn	Leu	Met	Asp	Ile	Leu	Glu	Val	Asp	Thr	Lys	Lys	
		115					120					125				
cag	att	gtc	cgt	gtg	gag	ccc	ttg	gtg	acc	atg	ggc	cag	gtg	act	gcc	432
Gln	Ile	Val	Arg	Val	Glu	Pro	Leu	Val	Thr	Met	Gly	Gln	Val	Thr	Ala	
	130					135					140					
ctg	ctg	acc	tcc	att	ggc	tgg	act	ctc	ccc	gtg	ttg	cct	gag	ctt	gat	480
Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Gly	Trp	Thr	Leu	Pro	Val	Leu	Pro	Glu	Leu	Asp	
145					150				155						160	
gac	ctc	aca	gtg	ggg	ggc	ttg	atc	atg	ggc	aca	ggc	atc	gag	tca	tca	528
Asp	Leu	Thr	Val	Gly	Gly	Leu	Ile	Met	Gly	Thr	Gly	Ile	Glu	Ser	Ser	
			165						170					175		
tcc	cac	aag	tac	ggc	ctg	ttc	caa	cac	atc	tgc	act	gct	tac	gag	ctg	576
Ser	His	Lys	Tyr	Gly	Leu	Phe	Gln	His	Ile	Cys	Thr	Ala	Tyr	Glu	Leu	
			180					185					190			
gtc	ctg	gct	gat	ggc	agc	ttt	gtg	cga	tgc	act	ccg	tcc	gaa	aac	tca	624
Val	Leu	Ala	Asp	Gly	Ser	Phe	Val	Arg	Cys	Thr	Pro	Ser	Glu	Asn	Ser	
		195					200					205				
gac	ctg	ttc	tat	gcc	gta	ccc	tgg	tcc	tgt	ggg	acg	ctg	ggt	ttc	ctg	672
Asp	Leu	Phe	Tyr	Ala	Val	Pro	Trp	Ser	Cys	Gly	Thr	Leu	Gly	Phe	Leu	
	210					215					220					
gtg	gcc	gct	gag	atc	cgc	atc	atc	cct	gcc	aag	aag	tac	gtc	aag	ctg	720
Val	Ala	Ala	Glu	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	Ala	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Leu	
225					230					235					240	
cgt	ttc	gag	cca	gtg	cgg	ggc	ctg	gag	gct	atc	tgt	gcc	aag	ttc	acc	768
Arg	Phe	Glu	Pro	Val	Arg	Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Cys	Ala	Lys	Phe	Thr	
			245					250						255		
cac	gag	tcc	cag	cgg	cag	gag	aac	cac	ttc	gtg	gaa	ggg	ctg	ctc	tac	816
His	Glu	Ser	Gln	Arg	Gln	Glu	Asn	His	Phe	Val	Glu	Gly	Leu	Leu	Tyr	
			260					265					270			
tcc	ctg	gat	gag	gct	gtc	att	atg	aca	ggg	gtc	atg	aca	gat	gag	gca	864
Ser	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Ile	Met	Thr	Gly	Val	Met	Thr	Asp	Glu	Ala	
		275					280					285				
gag	ccc	agc	aag	ctg	aat	agc	att	ggc	aat	tac	tac	aag	ccg	tgg	ttc	912
Glu	Pro	Ser	Lys	Leu	Asn	Ser	Ile	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Pro	Trp	Phe	
	290					295					300					
ttt	aag	cat	gtg	gag	aac	tat	ctg	aag	aca	aac	cga	gag	ggc	ctg	gag	960
Phe	Lys	His	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Lys	Thr	Asn	Arg	Glu	Gly	Leu	Glu	

305	310	315	320	
tac att ccc ttg aga cac tac tac cac cgc cac acg cgc agc atc ttc				1008
Tyr Ile Pro Leu Arg His Tyr Tyr His Arg His Thr Arg Ser Ile Phe				
	325	330	335	
tgg gag ctc cag gac atc atc ccc ttt ggc aac aac ccc atc ttc cgc				1056
Trp Glu Leu Gln Asp Ile Ile Pro Phe Gly Asn Asn Pro Ile Phe Arg				
	340	345	350	
tac ctc ttt ggc tgg atg gtg cct ccc aag atc tcc ctc ctg aag ctg				1104
Tyr Leu Phe Gly Trp Met Val Pro Pro Lys Ile Ser Leu Leu Lys Leu				
	355	360	365	
acc cag ggt gag acc ctg cgc aag ctg tac gag cag cac cac gtg gtg				1152
Thr Gln Gly Glu Thr Leu Arg Lys Leu Tyr Glu Gln His His Val Val				
	370	375	380	
cag gac atg ctg gtg ccc atg aag tgc ctg cag cag gcc ctg cac acc				1200
Gln Asp Met Leu Val Pro Met Lys Cys Leu Gln Gln Ala Leu His Thr				
	385	390	395	400
ttc caa aac gac atc cac gtc tac ccc atc tgg ctg tgt ccg ttc atc				1248
Phe Gln Asn Asp Ile His Val Tyr Pro Ile Trp Leu Cys Pro Phe Ile				
	405	410	415	
ctg ccc agc cag cca ggc cta gtg cac ccc aaa gga aat gag gca gag				1296
Leu Pro Ser Gln Pro Gly Leu Val His Pro Lys Gly Asn Glu Ala Glu				
	420	425	430	
ctc tac atc gac att gga gca tat ggg gag ccg cgt gtg aaa cac ttt				1344
Leu Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Val Lys His Phe				
	435	440	445	
gaa gcc agg tcc tgc atg agg cag ctg gag aag ttt gtc cgc agc gtg				1392
Glu Ala Arg Ser Cys Met Arg Gln Leu Glu Lys Phe Val Arg Ser Val				
	450	455	460	
cat ggc ttc cag atg ctg tat gcc gac tgc tac atg aac cgg gag gag				1440
His Gly Phe Gln Met Leu Tyr Ala Asp Cys Tyr Met Asn Arg Glu Glu				
	465	470	475	480
ttc tgg gag atg ttt gat ggc tcc ttg tac cac aag ctg cga gag aag				1488
Phe Trp Glu Met Phe Asp Gly Ser Leu Tyr His Lys Leu Arg Glu Lys				
	485	490	495	
ctg ggt tgc cag gac gcc ttc ccc gag gtg tac gac aag atc tgc aag				1536
Leu Gly Cys Gln Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile Cys Lys				
	500	505	510	
gcc gcc agg cac tga				1551
Ala Ala Arg His				
	515			

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 516

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 16

```

Met Glu Pro Ala Val Ser Leu Ala Val Cys Ala Leu Leu Phe Leu Leu
  1          5          10          15

Trp Val Arg Leu Lys Gly Leu Glu Phe Val Leu Ile His Gln Arg Trp
      20          25          30

Val Phe Val Cys Leu Phe Leu Leu Pro Leu Ser Leu Ile Phe Asp Ile
      35          40          45

Tyr Tyr Tyr Val Arg Ala Trp Val Val Phe Lys Leu Ser Ser Ala Pro
  50          55          60

Arg Leu His Glu Gln Arg Val Arg Asp Ile Gln Lys Gln Val Arg Glu
  65          70          75          80

Trp Lys Glu Gln Gly Ser Lys Thr Phe Met Cys Thr Gly Arg Pro Gly
      85          90          95

Trp Leu Thr Val Ser Leu Arg Val Gly Lys Tyr Lys Lys Thr His Lys
      100          105          110

Asn Ile Met Ile Asn Leu Met Asp Ile Leu Glu Val Asp Thr Lys Lys
      115          120          125

Gln Ile Val Arg Val Glu Pro Leu Val Thr Met Gly Gln Val Thr Ala
      130          135          140

Leu Leu Thr Ser Ile Gly Trp Thr Leu Pro Val Leu Pro Glu Leu Asp
      145          150          155          160

Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Ile Met Gly Thr Gly Ile Glu Ser Ser
      165          170          175

Ser His Lys Tyr Gly Leu Phe Gln His Ile Cys Thr Ala Tyr Glu Leu
      180          185          190

Val Leu Ala Asp Gly Ser Phe Val Arg Cys Thr Pro Ser Glu Asn Ser
      195          200          205

Asp Leu Phe Tyr Ala Val Pro Trp Ser Cys Gly Thr Leu Gly Phe Leu
      210          215          220

Val Ala Ala Glu Ile Arg Ile Ile Pro Ala Lys Lys Tyr Val Lys Leu
      225          230          235          240

Arg Phe Glu Pro Val Arg Gly Leu Glu Ala Ile Cys Ala Lys Phe Thr
      245          250          255

His Glu Ser Gln Arg Gln Glu Asn His Phe Val Glu Gly Leu Leu Tyr
      260          265          270

Ser Leu Asp Glu Ala Val Ile Met Thr Gly Val Met Thr Asp Glu Ala
      275          280          285

```

Glu Pro Ser Lys Leu Asn Ser Ile Gly Asn Tyr Tyr Lys Pro Trp Phe  
 290 295 300  
 Phe Lys His Val Glu Asn Tyr Leu Lys Thr Asn Arg Glu Gly Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Tyr Ile Pro Leu Arg His Tyr Tyr His Arg His Thr Arg Ser Ile Phe  
 325 330 335  
 Trp Glu Leu Gln Asp Ile Ile Pro Phe Gly Asn Asn Pro Ile Phe Arg  
 340 345 350  
 Tyr Leu Phe Gly Trp Met Val Pro Pro Lys Ile Ser Leu Leu Lys Leu  
 355 360 365  
 Thr Gln Gly Glu Thr Leu Arg Lys Leu Tyr Glu Gln His His Val Val  
 370 375 380  
 Gln Asp Met Leu Val Pro Met Lys Cys Leu Gln Gln Ala Leu His Thr  
 385 390 395 400  
 Phe Gln Asn Asp Ile His Val Tyr Pro Ile Trp Leu Cys Pro Phe Ile  
 405 410 415  
 Leu Pro Ser Gln Pro Gly Leu Val His Pro Lys Gly Asn Glu Ala Glu  
 420 425 430  
 Leu Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Val Lys His Phe  
 435 440 445  
 Glu Ala Arg Ser Cys Met Arg Gln Leu Glu Lys Phe Val Arg Ser Val  
 450 455 460  
 His Gly Phe Gln Met Leu Tyr Ala Asp Cys Tyr Met Asn Arg Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Phe Trp Glu Met Phe Asp Gly Ser Leu Tyr His Lys Leu Arg Glu Lys  
 485 490 495  
 Leu Gly Cys Gln Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile Cys Lys  
 500 505 510  
 Ala Ala Arg His  
 515

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1422

&lt;212&gt; DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1422)

&lt;400&gt; 17

25

atg gca aag gat aat agt gag aag ctg cag gtg cag gga gag gag aaa	48
Met Ala Lys Asp Asn Ser Glu Lys Leu Gln Val Gln Gly Glu Glu Lys	
1 5 10 15	
aag tcc aag caa ccg gtt aat ttc ctg cct cag ggt aaa tgg ctg aag	96
Lys Ser Lys Gln Pro Val Asn Phe Leu Pro Gln Gly Lys Trp Leu Lys	
20 25 30	
cca aat gaa atc gaa tat gag ttt ggt ggg act act ggt gtt att ggt	144
Pro Asn Glu Ile Glu Tyr Glu Phe Gly Gly Thr Thr Gly Val Ile Gly	
35 40 45	
atg ctg atc ggg ttt cca ctg cta atg tac tat atg tgg att tgt gcg	192
Met Leu Ile Gly Phe Pro Leu Leu Met Tyr Tyr Met Trp Ile Cys Ala	
50 55 60	
gaa ttt tat cac ggt aag gtt gcc cta ccc aag gct ggt gaa tcg tgg	240
Glu Phe Tyr His Gly Lys Val Ala Leu Pro Lys Ala Gly Glu Ser Trp	
65 70 75 80	
atg cac ttt atc aag cac cta tac cag tta gtc ttg gag aac ggt atc	288
Met His Phe Ile Lys His Leu Tyr Gln Leu Val Leu Glu Asn Gly Ile	
85 90 95	
cca gaa aag tat gac tgg act att ttc tta aca ttt tgg gtg ttt cag	336
Pro Glu Lys Tyr Asp Trp Thr Ile Phe Leu Thr Phe Trp Val Phe Gln	
100 105 110	
atc att ttc tac tat acg ttg ccc ggg att tgg aca aaa ggt caa cca	384
Ile Ile Phe Tyr Tyr Thr Leu Pro Gly Ile Trp Thr Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
ttg tct cat ttg aag gga aaa caa ttg cct tac ttt tgt aat gcc atg	432
Leu Ser His Leu Lys Gly Lys Gln Leu Pro Tyr Phe Cys Asn Ala Met	
130 135 140	
tgg acc ttg tat gta act acc act ttg gtc ttg gtt ttg cac ttt acc	480
Trp Thr Leu Tyr Val Thr Thr Thr Leu Val Leu Val Leu His Phe Thr	
145 150 155 160	
aat ctt ttt aga ttg tat gtc att att gac cgt ttt ggg agg atc atg	528
Asn Leu Phe Arg Leu Tyr Val Ile Ile Asp Arg Phe Gly Arg Ile Met	
165 170 175	
aca tgt gcc att att tca ggg ttt gcc ttc tcc atc ata ttg tac tta	576
Thr Cys Ala Ile Ile Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Ile Leu Tyr Leu	
180 185 190	
tgg act tta ttt atc tca cat gac tat cat aga atg aca gga aac cat	624
Trp Thr Leu Phe Ile Ser His Asp Tyr His Arg Met Thr Gly Asn His	
195 200 205	
cta tat gat ttc ttc atg gga gct cca cta aac cct agg tgg ggg att	672
Leu Tyr Asp Phe Phe Met Gly Ala Pro Leu Asn Pro Arg Trp Gly Ile	
210 215 220	
ttg gac ttg aag atg ttt ttc gag gtt aga tta cct tgg ttc acc ctt	720

Leu 225	Asp	Leu	Lys	Met	Phe 230	Phe	Glu	Val	Arg	Leu 235	Pro	Trp	Phe	Thr	Leu 240	
tac	ttt	atc	act	ttg	ggt	gcc	tgt	ttg	aag	cag	tgg	gag	act	tac	ggc	768
Tyr	Phe	Ile	Thr	Leu 245	Gly	Ala	Cys	Leu	Lys 250	Gln	Trp	Glu	Thr	Tyr 255	Gly	
tat	gtg	aca	cca	caa	ttg	ggg	gtt	gtc	atg	tta	gct	cat	tgg	ttg	tac	816
Tyr	Val	Thr	Pro 260	Gln	Leu	Gly	Val	Val 265	Met	Leu	Ala	His	Trp 270	Leu	Tyr	
gcg	aac	gca	tgt	gct	aaa	ggt	gaa	gaa	ttg	att	gtt	cca	acc	tgg	gac	864
Ala	Asn	Ala 275	Cys	Ala	Lys	Gly	Glu 280	Glu	Leu	Ile	Val	Pro 285	Thr	Trp	Asp	
atg	gct	tac	gaa	aag	ttt	gga	ttt	atg	ctg	atc	ttc	tgg	aat	att	gcc	912
Met	Ala	Tyr	Glu	Lys	Phe	Gly 295	Phe	Met	Leu	Ile	Phe 300	Trp	Asn	Ile	Ala	
ggt	gtc	cca	tac	act	tac	tgt	cat	tgt	acg	ttg	tat	ttg	tac	tac	cat	960
Gly 305	Val	Pro	Tyr	Thr	Tyr 310	Cys	His	Cys	Thr	Leu 315	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	His 320	
gac	cca	tct	gaa	tat	cac	tgg	tct	aca	ctg	tac	aat	gtt	tcg	ctg	tac	1008
Asp	Pro	Ser	Glu	Tyr 325	His	Trp	Ser	Thr	Leu 330	Tyr	Asn	Val	Ser	Leu 335	Tyr	
gtt	gtt	cta	tta	tgc	gcc	tac	tac	ttc	ttt	gac	acg	gca	aat	gct	cag	1056
Val	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Tyr	Tyr	Phe 345	Phe	Asp	Thr	Ala	Asn 350	Ala	Gln	
aaa	aat	gcc	ttc	aga	aag	caa	atg	tct	ggt	gac	aag	aca	ggt	agg	aag	1104
Lys	Asn	Ala 355	Phe	Arg	Lys	Gln	Met 360	Ser	Gly	Asp	Lys	Thr 365	Gly	Arg	Lys	
act	ttc	cca	ttt	ttg	cca	tac	caa	att	ttg	aag	aat	cca	aag	tat	atg	1152
Thr	Phe	Pro	Phe	Leu	Pro	Tyr 375	Gln	Ile	Leu	Lys	Asn 380	Pro	Lys	Tyr	Met	
gtt	acc	tcc	aat	gga	tcg	tac	cta	ttg	att	gat	ggt	tgg	tac	act	ttg	1200
Val	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser 390	Tyr	Leu	Leu	Ile	Asp 395	Gly	Trp	Tyr	Thr	Leu 400	
gct	aga	aaa	att	cac	tac	act	gcc	gat	tgg	act	caa	tct	ctc	gtt	tgg	1248
Ala	Arg	Lys	Ile	His 405	Tyr	Thr	Ala	Asp	Trp 410	Thr	Gln	Ser	Leu	Val 415	Trp	
gcc	ttg	tct	tgc	ggg	ttc	aac	tcg	gtg	ttc	cca	tgg	ttt	ttc	cca	gta	1296
Ala	Leu	Ser	Cys 420	Gly	Phe	Asn	Ser	Val 425	Phe	Pro	Trp	Phe	Phe 430	Pro	Val	
ttc	ttc	ctt	gtt	gtc	ctg	att	cac	aga	gcc	ttc	aga	gac	caa	gca	aaa	1344
Phe	Phe	Leu	Val 435	Val	Leu	Ile	His 440	Arg	Ala	Phe	Arg	Asp 445	Gln	Ala	Lys	
tgt	aag	aga	aag	tac	gga	aaa	gat	tgg	gat	gag	tat	tgt	aaa	cat	tgc	1392
Cys	Lys	Arg	Lys	Tyr	Gly	Lys	Asp	Trp	Asp	Glu	Tyr	Cys	Lys	His	Cys	

450

455

460

1422

cct tac gtc ttt att cct tat gtt ttc tag  
 Pro Tyr Val Phe Ile Pro Tyr Val Phe  
 465 470

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 473

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 18

Met Ala Lys Asp Asn Ser Glu Lys Leu Gln Val Gln Gly Glu Glu Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Ser Lys Gln Pro Val Asn Phe Leu Pro Gln Gly Lys Trp Leu Lys  
 20 25 30  
 Pro Asn Glu Ile Glu Tyr Glu Phe Gly Gly Thr Thr Gly Val Ile Gly  
 35 40 45  
 Met Leu Ile Gly Phe Pro Leu Leu Met Tyr Tyr Met Trp Ile Cys Ala  
 50 55 60  
 Glu Phe Tyr His Gly Lys Val Ala Leu Pro Lys Ala Gly Glu Ser Trp  
 65 70 75 80  
 Met His Phe Ile Lys His Leu Tyr Gln Leu Val Leu Glu Asn Gly Ile  
 85 90 95  
 Pro Glu Lys Tyr Asp Trp Thr Ile Phe Leu Thr Phe Trp Val Phe Gln  
 100 105 110  
 Ile Ile Phe Tyr Tyr Thr Leu Pro Gly Ile Trp Thr Lys Gly Gln Pro  
 115 120 125  
 Leu Ser His Leu Lys Gly Lys Gln Leu Pro Tyr Phe Cys Asn Ala Met  
 130 135 140  
 Trp Thr Leu Tyr Val Thr Thr Thr Leu Val Leu Val Leu His Phe Thr  
 145 150 155 160  
 Asn Leu Phe Arg Leu Tyr Val Ile Ile Asp Arg Phe Gly Arg Ile Met  
 165 170 175  
 Thr Cys Ala Ile Ile Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Ile Leu Tyr Leu  
 180 185 190  
 Trp Thr Leu Phe Ile Ser His Asp Tyr His Arg Met Thr Gly Asn His  
 195 200 205  
 Leu Tyr Asp Phe Phe Met Gly Ala Pro Leu Asn Pro Arg Trp Gly Ile  
 210 215 220  
 Leu Asp Leu Lys Met Phe Phe Glu Val Arg Leu Pro Trp Phe Thr Leu  
 225 230 235 240

Tyr	Phe	Ile	Thr	Leu 245	Gly	Ala	Cys	Leu	Lys 250	Gln	Trp	Glu	Thr	Tyr	Gly 255
Tyr	Val	Thr	Pro 260	Gln	Leu	Gly	Val	Val 265	Met	Leu	Ala	His	Trp 270	Leu	Tyr
Ala	Asn	Ala 275	Cys	Ala	Lys	Gly	Glu 280	Glu	Leu	Ile	Val	Pro 285	Thr	Trp	Asp
Met	Ala 290	Tyr	Glu	Lys	Phe	Gly 295	Phe	Met	Leu	Ile	Phe 300	Trp	Asn	Ile	Ala
Gly 305	Val	Pro	Tyr	Thr	Tyr 310	Cys	His	Cys	Thr	Leu 315	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	His 320
Asp	Pro	Ser	Glu	Tyr 325	His	Trp	Ser	Thr	Leu 330	Tyr	Asn	Val	Ser	Leu 335	Tyr
Val	Val	Leu	Leu 340	Cys	Ala	Tyr	Tyr	Phe 345	Phe	Asp	Thr	Ala	Asn 350	Ala	Gln
Lys	Asn	Ala 355	Phe	Arg	Lys	Gln	Met 360	Ser	Gly	Asp	Lys	Thr 365	Gly	Arg	Lys
Thr	Phe 370	Pro	Phe	Leu	Pro	Tyr 375	Gln	Ile	Leu	Lys	Asn 380	Pro	Lys	Tyr	Met
Val 385	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser 390	Tyr	Leu	Leu	Ile	Asp 395	Gly	Trp	Tyr	Thr	Leu 400
Ala	Arg	Lys	Ile	His 405	Tyr	Thr	Ala	Asp	Trp 410	Thr	Gln	Ser	Leu	Val 415	Trp
Ala	Leu	Ser	Cys 420	Gly	Phe	Asn	Ser	Val 425	Phe	Pro	Trp	Phe	Phe 430	Pro	Val
Phe	Phe 435	Leu	Val	Val	Leu	Ile	His 440	Arg	Ala	Phe	Arg	Asp 445	Gln	Ala	Lys
Cys	Lys 450	Arg	Lys	Tyr	Gly	Lys 455	Asp	Trp	Asp	Glu	Tyr 460	Cys	Lys	His	Cys
Pro 465	Tyr	Val	Phe	Ile	Pro	Tyr 470	Val	Phe							

```
<210> 19
<211> 1152
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1152)
```

<400> 19



atg agt gaa aca gaa ttg aga aaa aga cag gcc caa ttc act agg gag	48
Met Ser Glu Thr Glu Leu Arg Lys Arg Gln Ala Gln Phe Thr Arg Glu	
1 5 10 15	
tta cat ggt gat gat att ggt aaa aag aca ggt ttg agt gca ttg atg	96
Leu His Gly Asp Asp Ile Gly Lys Lys Thr Gly Leu Ser Ala Leu Met	
20 25 30	
tcg aag aac aac tct gcc caa aag gaa gcc gtt cag aag tac ttg aga	144
Ser Lys Asn Asn Ser Ala Gln Lys Glu Ala Val Gln Lys Tyr Leu Arg	
35 40 45	
aat tgg gat ggt aga acc gat aaa gat gcc gaa gaa cgt cgt ctt gag	192
Asn Trp Asp Gly Arg Thr Asp Lys Asp Ala Glu Glu Arg Arg Leu Glu	
50 55 60	
gat tat aat gaa gcc aca cat tcc tac tat aac gtc gtt aca gat ttc	240
Asp Tyr Asn Glu Ala Thr His Ser Tyr Tyr Asn Val Val Thr Asp Phe	
65 70 75 80	
tat gaa tat ggt tgg ggt tcc tct ttc cat ttc agc aga ttt tat aaa	288
Tyr Glu Tyr Gly Trp Gly Ser Ser Phe His Phe Ser Arg Phe Tyr Lys	
85 90 95	
ggt gag agt ttc gct gcc tcg ata gca aga cat gaa cat tat tta gct	336
Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ser Ile Ala Arg His Glu His Tyr Leu Ala	
100 105 110	
tac aag gct ggt att caa aga ggc gat tta gtt ctc gac gtt ggt tgt	384
Tyr Lys Ala Gly Ile Gln Arg Gly Asp Leu Val Leu Asp Val Gly Cys	
115 120 125	
ggt gtt ggg ggc cca gca aga gag att gca aga ttt acc ggt tgt aac	432
Gly Val Gly Gly Pro Ala Arg Glu Ile Ala Arg Phe Thr Gly Cys Asn	
130 135 140	
gtc atc ggt cta aac aat aac gat tac caa att gcc aag gca aaa tat	480
Val Ile Gly Leu Asn Asn Asn Asp Tyr Gln Ile Ala Lys Ala Lys Tyr	
145 150 155 160	
tac gct aaa aaa tac aat ttg agt gac caa atg gac ttt gta aag ggt	528
Tyr Ala Lys Lys Tyr Asn Leu Ser Asp Gln Met Asp Phe Val Lys Gly	
165 170 175	
gat ttc atg aaa atg gat ttc gaa gaa aac act ttc gac aaa gtt tat	576
Asp Phe Met Lys Met Asp Phe Glu Glu Asn Thr Phe Asp Lys Val Tyr	
180 185 190	
gca att gag gcc aca tgt cac gct cca aaa tta gaa ggt gta tac agc	624
Ala Ile Glu Ala Thr Cys His Ala Pro Lys Leu Glu Gly Val Tyr Ser	
195 200 205	
gaa atc tac aag gtt ttg aaa ccg ggt ggt acc ttt gct gtt tac gaa	672
Glu Ile Tyr Lys Val Leu Lys Pro Gly Gly Thr Phe Ala Val Tyr Glu	
210 215 220	
tgg gta atg act gat aaa tat gac gaa aac aat cct gaa cat aga aag	720

Trp	Val	Met	Thr	Asp	Lys	Tyr	Asp	Glu	Asn	Asn	Pro	Glu	His	Arg	Lys	
225					230					235					240	
atc	gct	tat	gaa	att	gaa	cta	ggt	gat	ggt	atc	cca	aag	atg	ttc	cat	768
Ile	Ala	Tyr	Glu	Ile	Glu	Leu	Gly	Asp	Gly	Ile	Pro	Lys	Met	Phe	His	
				245					250					255		
gtc	gac	gtg	gct	agg	aaa	gca	ttg	aag	aac	tgt	ggt	ttc	gaa	gtc	ctc	816
Val	Asp	Val	Ala	Arg	Lys	Ala	Leu	Lys	Asn	Cys	Gly	Phe	Glu	Val	Leu	
			260					265					270			
gtt	agc	gaa	gac	ctg	gcg	gac	aat	gat	gat	gaa	atc	cct	tgg	tat	tac	864
Val	Ser	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Asn	Asp	Asp	Glu	Ile	Pro	Trp	Tyr	Tyr	
		275					280					285				
cca	tta	act	ggt	gag	tgg	aag	tac	gtt	caa	aac	tta	gct	aat	ttg	gcc	912
Pro	Leu	Thr	Gly	Glu	Trp	Lys	Tyr	Val	Gln	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Ala	
	290					295					300					
aca	ttt	ttc	aga	act	tct	tac	ttg	ggt	aga	caa	ttt	act	aca	gca	atg	960
Thr	Phe	Phe	Arg	Thr	Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gln	Phe	Thr	Thr	Ala	Met	
305					310				315					320		
gtt	act	gta	atg	gaa	aaa	tta	ggt	cta	gcc	cca	gaa	ggt	tcc	aag	gaa	1008
Val	Thr	Val	Met	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Gly	Ser	Lys	Glu	
				325				330					335			
gtt	act	gct	gct	cta	gaa	aat	gct	gcg	gtt	ggt	tta	gtt	gcc	ggt	ggt	1056
Val	Thr	Ala	Ala	Leu	Glu	Asn	Ala	Ala	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Gly	Gly	
			340				345						350			
aag	tcc	aag	tta	ttc	act	cca	atg	atg	ctt	ttc	gtc	gct	agg	aag	cca	1104
Lys	Ser	Lys	Leu	Phe	Thr	Pro	Met	Met	Leu	Phe	Val	Ala	Arg	Lys	Pro	
		355					360					365				
gaa	aac	gcc	gaa	acc	ccc	tcc	caa	act	tcc	caa	gaa	gca	act	caa	taa	1152
Glu	Asn	Ala	Glu	Thr	Pro	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln	Glu	Ala	Thr	Gln		
	370					375					380					

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 383

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Saccharomyces cerevisiae

&lt;400&gt; 20

Met	Ser	Glu	Thr	Glu	Leu	Arg	Lys	Arg	Gln	Ala	Gln	Phe	Thr	Arg	Glu
1				5					10					15	

Leu	His	Gly	Asp	Asp	Ile	Gly	Lys	Lys	Thr	Gly	Leu	Ser	Ala	Leu	Met
			20				25						30		

Ser	Lys	Asn	Asn	Ser	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Val	Gln	Lys	Tyr	Leu	Arg
		35					40					45			

Asn	Trp	Asp	Gly	Arg	Thr	Asp	Lys	Asp	Ala	Glu	Glu	Arg	Arg	Leu	Glu
	50					55					60				

Asp Tyr Asn Glu Ala Thr His Ser Tyr Tyr Asn Val Val Thr Asp Phe  
 65 70 75 80  
 Tyr Glu Tyr Gly Trp Gly Ser Ser Phe His Phe Ser Arg Phe Tyr Lys  
 85 90 95  
 Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ser Ile Ala Arg His Glu His Tyr Leu Ala  
 100 105 110  
 Tyr Lys Ala Gly Ile Gln Arg Gly Asp Leu Val Leu Asp Val Gly Cys  
 115 120 125  
 Gly Val Gly Gly Pro Ala Arg Glu Ile Ala Arg Phe Thr Gly Cys Asn  
 130 135 140  
 Val Ile Gly Leu Asn Asn Asn Asp Tyr Gln Ile Ala Lys Ala Lys Tyr  
 145 150 155 160  
 Tyr Ala Lys Lys Tyr Asn Leu Ser Asp Gln Met Asp Phe Val Lys Gly  
 165 170 175  
 Asp Phe Met Lys Met Asp Phe Glu Glu Asn Thr Phe Asp Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Ile Glu Ala Thr Cys His Ala Pro Lys Leu Glu Gly Val Tyr Ser  
 195 200 205  
 Glu Ile Tyr Lys Val Leu Lys Pro Gly Gly Thr Phe Ala Val Tyr Glu  
 210 215 220  
 Trp Val Met Thr Asp Lys Tyr Asp Glu Asn Asn Pro Glu His Arg Lys  
 225 230 235 240  
 Ile Ala Tyr Glu Ile Glu Leu Gly Asp Gly Ile Pro Lys Met Phe His  
 245 250 255  
 Val Asp Val Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asn Cys Gly Phe Glu Val Leu  
 260 265 270  
 Val Ser Glu Asp Leu Ala Asp Asn Asp Asp Glu Ile Pro Trp Tyr Tyr  
 275 280 285  
 Pro Leu Thr Gly Glu Trp Lys Tyr Val Gln Asn Leu Ala Asn Leu Ala  
 290 295 300  
 Thr Phe Phe Arg Thr Ser Tyr Leu Gly Arg Gln Phe Thr Thr Ala Met  
 305 310 315 320  
 Val Thr Val Met Glu Lys Leu Gly Leu Ala Pro Glu Gly Ser Lys Glu  
 325 330 335  
 Val Thr Ala Ala Leu Glu Asn Ala Ala Val Gly Leu Val Ala Gly Gly  
 340 345 350  
 Lys Ser Lys Leu Phe Thr Pro Met Met Leu Phe Val Ala Arg Lys Pro  
 355 360 365

Glu Asn Ala Glu Thr Pro Ser Gln Thr Ser Gln Glu Ala Thr Gln  
 370 375 380

<210> 21  
 <211> 1617  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1617)

<400> 21  
 atg agt tct gtc gca gaa aat ata ata caa cat gcc act cat aat tct 48  
 Met Ser Ser Val Ala Glu Asn Ile Ile Gln His Ala Thr His Asn Ser  
 1 5 10 15

acg cta cac caa ttg gct aaa gac cag ccc tct gta ggc gtc act act 96  
 Thr Leu His Gln Leu Ala Lys Asp Gln Pro Ser Val Gly Val Thr Thr  
 20 25 30

gcc ttc agt atc ctg gat aca ctt aag tct atg tca tat ttg aaa ata 144  
 Ala Phe Ser Ile Leu Asp Thr Leu Lys Ser Met Ser Tyr Leu Lys Ile  
 35 40 45

ttt gct act tta atc tgt att ctt ttg gtt tgg gac caa gtt gca tat 192  
 Phe Ala Thr Leu Ile Cys Ile Leu Leu Val Trp Asp Gln Val Ala Tyr  
 50 55 60

caa atc aag aaa ggt tcc atc gca ggt cca aag ttt aag ttc tgg ccc 240  
 Gln Ile Lys Lys Gly Ser Ile Ala Gly Pro Lys Phe Lys Phe Trp Pro  
 65 70 75 80

atc atc ggt cca ttt ttg gaa tcc tta gat cca aag ttt gaa gaa tat 288  
 Ile Ile Gly Pro Phe Leu Glu Ser Leu Asp Pro Lys Phe Glu Glu Tyr  
 85 90 95

aag gct aag tgg gca tcc ggt cca ctt tca tgt gtt tct att ttc cat 336  
 Lys Ala Lys Trp Ala Ser Gly Pro Leu Ser Cys Val Ser Ile Phe His  
 100 105 110

aaa ttt gtt gtt atc gca tct act aga gac ttg gca aga aag atc ttg 384  
 Lys Phe Val Val Ile Ala Ser Thr Arg Asp Leu Ala Arg Lys Ile Leu  
 115 120 125

caa tct tcc aaa ttc gtc aaa cct tgc gtt gtc gat gtt gct gtg aag 432  
 Gln Ser Ser Lys Phe Val Lys Pro Cys Val Val Asp Val Ala Val Lys  
 130 135 140

atc tta aga cct tgc aat tgg gtt ttt ttg gac ggt aaa gct cat act 480  
 Ile Leu Arg Pro Cys Asn Trp Val Phe Leu Asp Gly Lys Ala His Thr  
 145 150 155 160

gat tac aga aaa tca tta aac ggt ctt ttc act aaa caa gct ttg gct 528  
 Asp Tyr Arg Lys Ser Leu Asn Gly Leu Phe Thr Lys Gln Ala Leu Ala

165										170					175					
caa	tac	tta	cct	tca	ttg	gaa	caa	atc	atg	gat	aag	tac	atg	gat	aag	576				
Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu	Glu	Gln	Ile	Met	Asp	Lys	Tyr	Met	Asp	Lys					
			180					185					190							
ttt	gtt	cgt	tta	tct	aag	gag	aat	aac	tac	gag	ccc	cag	gtc	ttt	ttc	624				
Phe	Val	Arg	Leu	Ser	Lys	Glu	Asn	Asn	Tyr	Glu	Pro	Gln	Val	Phe	Phe					
		195					200					205								
cat	gaa	atg	aga	gaa	att	ctt	tgc	gcc	tta	tca	ttg	aac	tct	ttc	tgt	672				
His	Glu	Met	Arg	Glu	Ile	Leu	Cys	Ala	Leu	Ser	Leu	Asn	Ser	Phe	Cys					
	210					215					220									
ggt	aac	tat	att	acc	gaa	gat	caa	gtc	aga	aag	att	gct	gat	gat	tac	720				
Gly	Asn	Tyr	Ile	Thr	Glu	Asp	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Ala	Asp	Asp	Tyr					
225					230				235					240						
tat	ttg	gtt	aca	gca	gca	ttg	gaa	tta	gtc	aac	ttc	cca	att	att	atc	768				
Tyr	Leu	Val	Thr	Ala	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Asn	Phe	Pro	Ile	Ile	Ile					
			245					250						255						
cct	tac	act	aaa	aca	tgg	tat	ggt	aag	aaa	act	gca	gac	atg	gcc	atg	816				
Pro	Tyr	Thr	Lys	Thr	Trp	Tyr	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Asp	Met	Ala	Met					
			260					265					270							
aag	att	ttc	gaa	aac	tgt	gct	caa	atg	gct	aag	gat	cat	att	gct	gca	864				
Lys	Ile	Phe	Glu	Asn	Cys	Ala	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	His	Ile	Ala	Ala					
		275					280					285								
ggt	ggt	aag	cca	gtt	tgt	gtt	atg	gat	gct	tgg	tgt	aag	ttg	atg	cac	912				
Gly	Gly	Lys	Pro	Val	Cys	Val	Met	Asp	Ala	Trp	Cys	Lys	Leu	Met	His					
	290					295					300									
gat	gca	aag	aat	agt	aac	gat	gat	gat	tct	aga	atc	tac	cac	aga	gag	960				
Asp	Ala	Lys	Asn	Ser	Asn	Asp	Asp	Asp	Ser	Arg	Ile	Tyr	His	Arg	Glu					
305					310				315						320					
ttt	act	aac	aag	gaa	atc	tcc	gaa	gct	gtt	ttc	act	ttc	tta	ttt	gct	1008				
Phe	Thr	Asn	Lys	Glu	Ile	Ser	Glu	Ala	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Phe	Ala					
				325				330						335						
tct	caa	gat	gcc	tct	tct	tct	tta	gct	tgt	tgg	ttg	ttc	caa	att	gtt	1056				
Ser	Gln	Asp	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Ala	Cys	Trp	Leu	Phe	Gln	Ile	Val					
			340					345					350							
gct	gac	cgt	cca	gat	gtc	tta	gct	aag	atc	aga	gaa	gaa	caa	ttg	gct	1104				
Ala	Asp	Arg	Pro	Asp	Val	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Glu	Glu	Gln	Leu	Ala					
		355					360					365								
gtt	cgt	aac	aat	gac	atg	tct	acc	gaa	ttg	aac	ttg	gat	ttg	att	gag	1152				
Val	Arg	Asn	Asn	Asp	Met	Ser	Thr	Glu	Leu	Asn	Leu	Asp	Leu	Ile	Glu					
		370				375					380									
aaa	atg	aag	tac	acc	aat	atg	gtc	ata	aaa	gaa	act	ttg	cgt	tac	aga	1200				
Lys	Met	Lys	Tyr	Thr	Asn	Met	Val	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Arg					
385					390					395					400					

cct cct gtc ttg atg gtt cca tat gtt gtt aag aag aat ttc cca gtt 1248  
 Pro Pro Val Leu Met Val Pro Tyr Val Val Lys Lys Asn Phe Pro Val  
 405 410 415  
 tcc cct aac tat acc gca cca aag ggc gct atg tta att cca acc tta 1296  
 Ser Pro Asn Tyr Thr Ala Pro Lys Gly Ala Met Leu Ile Pro Thr Leu  
 420 425 430  
 tac cca gct tta cat gat cct gaa gtt tac gaa aat cct gat gag ttc 1344  
 Tyr Pro Ala Leu His Asp Pro Glu Val Tyr Glu Asn Pro Asp Glu Phe  
 435 440 445  
 atc cct gaa aga tgg gta gaa ggc tct aag gct agt gaa gca aag aag 1392  
 Ile Pro Glu Arg Trp Val Glu Gly Ser Lys Ala Ser Glu Ala Lys Lys  
 450 455 460  
 aat tgg ttg gtt ttt ggt tgt ggt cca cac gtt tgc tta ggt caa aca 1440  
 Asn Trp Leu Val Phe Gly Cys Gly Pro His Val Cys Leu Gly Gln Thr  
 465 470 475 480  
 tat gtc atg att acc ttc gcc gct ttg ttg ggt aaa ttt gca cta tat 1488  
 Tyr Val Met Ile Thr Phe Ala Ala Leu Leu Gly Lys Phe Ala Leu Tyr  
 485 490 495  
 act gat ttc cat cat aca gtg act cca tta agt gaa aaa atc aag gtt 1536  
 Thr Asp Phe His His Thr Val Thr Pro Leu Ser Glu Lys Ile Lys Val  
 500 505 510  
 ttc gct aca att ttc cca aaa gat gat ttg tta ctg act ttc aaa aag 1584  
 Phe Ala Thr Ile Phe Pro Lys Asp Asp Leu Leu Leu Thr Phe Lys Lys  
 515 520 525  
 aga gac cca att act gga gaa gtc ttc gaa taa 1617  
 Arg Asp Pro Ile Thr Gly Glu Val Phe Glu  
 530 535

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 538

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 22

Met Ser Ser Val Ala Glu Asn Ile Ile Gln His Ala Thr His Asn Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Leu His Gln Leu Ala Lys Asp Gln Pro Ser Val Gly Val Thr Thr  
 20 25 30  
 Ala Phe Ser Ile Leu Asp Thr Leu Lys Ser Met Ser Tyr Leu Lys Ile  
 35 40 45  
 Phe Ala Thr Leu Ile Cys Ile Leu Leu Val Trp Asp Gln Val Ala Tyr  
 50 55 60  
 Gln Ile Lys Lys Gly Ser Ile Ala Gly Pro Lys Phe Lys Phe Trp Pro

35

65	70					75					80				
Ile	Ile	Gly	Pro	Phe	Leu	Glu	Ser	Leu	Asp	Pro	Lys	Phe	Glu	Glu	Tyr
				85					90					95	
Lys	Ala	Lys	Trp	Ala	Ser	Gly	Pro	Leu	Ser	Cys	Val	Ser	Ile	Phe	His
			100					105					110		
Lys	Phe	Val	Val	Ile	Ala	Ser	Thr	Arg	Asp	Leu	Ala	Arg	Lys	Ile	Leu
		115					120					125			
Gln	Ser	Ser	Lys	Phe	Val	Lys	Pro	Cys	Val	Val	Asp	Val	Ala	Val	Lys
	130					135					140				
Ile	Leu	Arg	Pro	Cys	Asn	Trp	Val	Phe	Leu	Asp	Gly	Lys	Ala	His	Thr
145					150					155					160
Asp	Tyr	Arg	Lys	Ser	Leu	Asn	Gly	Leu	Phe	Thr	Lys	Gln	Ala	Leu	Ala
				165					170					175	
Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu	Glu	Gln	Ile	Met	Asp	Lys	Tyr	Met	Asp	Lys
			180					185					190		
Phe	Val	Arg	Leu	Ser	Lys	Glu	Asn	Asn	Tyr	Glu	Pro	Gln	Val	Phe	Phe
		195					200					205			
His	Glu	Met	Arg	Glu	Ile	Leu	Cys	Ala	Leu	Ser	Leu	Asn	Ser	Phe	Cys
	210					215					220				
Gly	Asn	Tyr	Ile	Thr	Glu	Asp	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Ala	Asp	Asp	Tyr
225					230					235					240
Tyr	Leu	Val	Thr	Ala	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Asn	Phe	Pro	Ile	Ile	Ile
				245					250					255	
Pro	Tyr	Thr	Lys	Thr	Trp	Tyr	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Asp	Met	Ala	Met
			260					265					270		
Lys	Ile	Phe	Glu	Asn	Cys	Ala	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	His	Ile	Ala	Ala
		275					280					285			
Gly	Gly	Lys	Pro	Val	Cys	Val	Met	Asp	Ala	Trp	Cys	Lys	Leu	Met	His
	290					295					300				
Asp	Ala	Lys	Asn	Ser	Asn	Asp	Asp	Asp	Ser	Arg	Ile	Tyr	His	Arg	Glu
305					310					315					320
Phe	Thr	Asn	Lys	Glu	Ile	Ser	Glu	Ala	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Phe	Ala
				325					330					335	
Ser	Gln	Asp	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Ala	Cys	Trp	Leu	Phe	Gln	Ile	Val
			340					345					350		
Ala	Asp	Arg	Pro	Asp	Val	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Glu	Glu	Gln	Leu	Ala
		355					360					365			
Val	Arg	Asn	Asn	Asp	Met	Ser	Thr	Glu	Leu	Asn	Leu	Asp	Leu	Ile	Glu

370		375		380
Lys Met Lys Tyr Thr Asn Met Val Ile Lys Glu Thr Leu Arg Tyr Arg				
385		390		395
Pro Pro Val Leu Met Val Pro Tyr Val Val Lys Lys Asn Phe Pro Val				
	405		410	415
Ser Pro Asn Tyr Thr Ala Pro Lys Gly Ala Met Leu Ile Pro Thr Leu				
	420		425	430
Tyr Pro Ala Leu His Asp Pro Glu Val Tyr Glu Asn Pro Asp Glu Phe				
	435		440	445
Ile Pro Glu Arg Trp Val Glu Gly Ser Lys Ala Ser Glu Ala Lys Lys				
	450		455	460
Asn Trp Leu Val Phe Gly Cys Gly Pro His Val Cys Leu Gly Gln Thr				
465		470		475
Tyr Val Met Ile Thr Phe Ala Ala Leu Leu Gly Lys Phe Ala Leu Tyr				
	485		490	495
Thr Asp Phe His His Thr Val Thr Pro Leu Ser Glu Lys Ile Lys Val				
	500		505	510
Phe Ala Thr Ile Phe Pro Lys Asp Asp Leu Leu Leu Thr Phe Lys Lys				
	515		520	525
Arg Asp Pro Ile Thr Gly Glu Val Phe Glu				
530		535		

<210> 23  
 <211> 1578  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: trunkierte  
 HMG

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1578)

<400> 23	
atg gac caa ttg gtg aaa act gaa gtc acc aag aag tct ttt act gct	48
Met Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr Ala	
1 5 10 15	
cct gta caa aag gct tct aca cca gtt tta acc aat aaa aca gtc att	96
Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val Ile	
20 25 30	
tct gga tcg aaa gtc aaa agt tta tca tct gcg caa tcg agc tca tca	144
Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser Ser	



35						40						45						
gga	cct	tca	tca	tct	agt	gag	gaa	gat	gat	tcc	cgc	gat	att	gaa	agc	192		
Gly	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Asp	Asp	Ser	Arg	Asp	Ile	Glu	Ser			
	50					55					60							
ttg	gat	aag	aaa	ata	cgt	cct	tta	gaa	gaa	tta	gaa	gca	tta	tta	agt	240		
Leu	Asp	Lys	Lys	Ile	Arg	Pro	Leu	Glu	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Ser			
65					70					75					80			
agt	gga	aat	aca	aaa	caa	ttg	aag	aac	aaa	gag	gtc	gct	gcc	ttg	gtt	288		
Ser	Gly	Asn	Thr	Lys	Gln	Leu	Lys	Asn	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Val			
				85					90					95				
att	cac	ggt	aag	tta	cct	ttg	tac	gct	ttg	gag	aaa	aaa	tta	ggt	gat	336		
Ile	His	Gly	Lys	Leu	Pro	Leu	Tyr	Ala	Leu	Glu	Lys	Lys	Leu	Gly	Asp			
			100					105					110					
act	acg	aga	gcg	gtt	gcg	gta	cgt	agg	aag	gct	ctt	tca	att	ttg	gca	384		
Thr	Thr	Arg	Ala	Val	Ala	Val	Arg	Arg	Lys	Ala	Leu	Ser	Ile	Leu	Ala			
		115					120					125						
gaa	gct	cct	gta	tta	gca	tct	gat	cgt	tta	cca	tat	aaa	aat	tat	gac	432		
Glu	Ala	Pro	Val	Leu	Ala	Ser	Asp	Arg	Leu	Pro	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Asp			
	130					135					140							
tac	gac	cgc	gta	ttt	ggc	gct	tgt	tgt	gaa	aat	gtt	ata	ggt	tac	atg	480		
Tyr	Asp	Arg	Val	Phe	Gly	Ala	Cys	Cys	Glu	Asn	Val	Ile	Gly	Tyr	Met			
145					150					155					160			
cct	ttg	ccc	gtt	ggt	gtt	ata	ggc	ccc	ttg	gtt	atc	gat	ggt	aca	tct	528		
Pro	Leu	Pro	Val	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Leu	Val	Ile	Asp	Gly	Thr	Ser			
				165					170					175				
tat	cat	ata	cca	atg	gca	act	aca	gag	ggt	tgt	ttg	gta	gct	tct	gcc	576		
Tyr	His	Ile	Pro	Met	Ala	Thr	Thr	Glu	Gly	Cys	Leu	Val	Ala	Ser	Ala			
			180					185					190					
atg	cgt	ggc	tgt	aag	gca	atc	aat	gct	ggc	ggt	ggt	gca	aca	act	gtt	624		
Met	Arg	Gly	Cys	Lys	Ala	Ile	Asn	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Thr	Val			
		195					200					205						
tta	act	aag	gat	ggt	atg	aca	aga	ggc	cca	gta	gtc	cgt	ttc	cca	act	672		
Leu	Thr	Lys	Asp	Gly	Met	Thr	Arg	Gly	Pro	Val	Val	Arg	Phe	Pro	Thr			
	210					215					220							
ttg	aaa	aga	tct	ggt	gcc	tgt	aag	ata	tgg	tta	gac	tca	gaa	gag	gga	720		
Leu	Lys	Arg	Ser	Gly	Ala	Cys	Lys	Ile	Trp	Leu	Asp	Ser	Glu	Glu	Gly			
225					230					235					240			
caa	aac	gca	att	aaa	aaa	gct	ttt	aac	tct	aca	tca	aga	ttt	gca	cgt	768		
Gln	Asn	Ala	Ile	Lys	Lys	Ala	Phe	Asn	Ser	Thr	Ser	Arg	Phe	Ala	Arg			
				245					250					255				
ctg	caa	cat	att	caa	act	tgt	cta	gca	gga	gat	tta	ctc	ttc	atg	aga	816		
Leu	Gln	His	Ile	Gln	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Arg			
			260					265					270					

ttt aga aca act act ggt gac gca atg ggt atg aat atg att tct aaa	864
Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser Lys	
275 280 285	
ggt gtc gaa tac tca tta aag caa atg gta gaa gag tat ggc tgg gaa	912
Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp Glu	
290 295 300	
gat atg gag gtt gtc tcc gtt tct ggt aac tac tgt acc gac aaa aaa	960
Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys Lys	
305 310 315 320	
cca gct gcc atc aac tgg atc gaa ggt cgt ggt aag agt gtc gtc gca	1008
Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Ala	
325 330 335	
gaa gct act att cct ggt gat gtt gtc aga aaa gtg tta aaa agt gat	1056
Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser Asp	
340 345 350	
gtt tcc gca ttg gtt gag ttg aac att gct aag aat ttg gtt gga tct	1104
Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly Ser	
355 360 365	
gca atg gct ggg tct gtt ggt gga ttt aac gca cat gca gct aat tta	1152
Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn Leu	
370 375 380	
gtg aca gct gtt ttc ttg gca tta gga caa gat cct gca caa aat gtt	1200
Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val	
385 390 395 400	
gaa agt tcc aac tgt ata aca ttg atg aaa gaa gtg gac ggt gat ttg	1248
Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp Leu	
405 410 415	
aga att tcc gta tcc atg cca tcc atc gaa gta ggt acc atc ggt ggt	1296
Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly Gly	
420 425 430	
ggt act gtt cta gaa cca caa ggt gcc atg ttg gac tta tta ggt gta	1344
Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly Val	
435 440 445	
aga ggc ccg cat gct acc gct cct ggt acc aac gca cgt caa tta gca	1392
Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu Ala	
450 455 460	
aga ata gtt gcc tgt gcc gtc ttg gca ggt gaa tta tcc tta tgt gct	1440
Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys Ala	
465 470 475 480	
gcc cta gca gcc ggc cat ttg gtt caa agt cat atg acc cac aac agg	1488
Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn Arg	
485 490 495	

aaa cct gct gaa cca aca aaa cct aac aat ttg gac gcc act gat ata 1536  
 Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp Ile  
                   500                                  505                                  510

aat cgt ttg aaa gat ggg tcc gtc acc tgc att aaa tcc taa 1578  
 Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser  
                   515                                  520                                  525

<210> 24

<211> 525

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 24

Met Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr Ala  
   1                                  5                                  10                                  15

Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val Ile  
                   20                                  25                                  30

Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser Ser  
                   35                                  40                                  45

Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu Ser  
                   50                                  55                                  60

Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu Ser  
   65                                  70                                  75                                  80

Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu Val  
                                   85                                  90                                  95

Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly Asp  
                   100                                  105                                  110

Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu Ala  
                   115                                  120                                  125

Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr Asp  
                   130                                  135                                  140

Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr Met  
   145                                  150                                  155                                  160

Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr Ser  
                   165                                  170                                  175

Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser Ala  
                   180                                  185                                  190

Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr Val  
                   195                                  200                                  205

Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro Thr  
                   210                                  215                                  220

Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu Gly  
 225 230 235 240  
 Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala Arg  
 245 250 255  
 Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met Arg  
 260 265 270  
 Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser Lys  
 275 280 285  
 Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp Glu  
 290 295 300  
 Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys Lys  
 305 310 315 320  
 Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Ala  
 325 330 335  
 Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser Asp  
 340 345 350  
 Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly Ser  
 355 360 365  
 Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn Leu  
 370 375 380  
 Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val  
 385 390 395 400  
 Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp Leu  
 405 410 415  
 Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly Gly  
 420 425 430  
 Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly Val  
 435 440 445  
 Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu Ala  
 450 455 460  
 Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys Ala  
 465 470 475 480  
 Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn Arg  
 485 490 495  
 Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp Ile  
 500 505 510  
 Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser  
 515 520 525

<210> 25  
 <211> 1593  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1593)

<400> 25  
 atg tct gct acc aag tca atc gtt gga gag gca ttg gaa tac gta aac 48  
 Met Ser Ala Thr Lys Ser Ile Val Gly Glu Ala Leu Glu Tyr Val Asn  
 1 5 10 15

att ggt tta agt cat ttc ttg gct tta cca ttg gcc caa aga atc tct 96  
 Ile Gly Leu Ser His Phe Leu Ala Leu Pro Leu Ala Gln Arg Ile Ser  
 20 25 30

ttg atc ata ata att cct ttc att tac aat att gta tgg caa tta cta 144  
 Leu Ile Ile Ile Ile Pro Phe Ile Tyr Asn Ile Val Trp Gln Leu Leu  
 35 40 45

tat tct ttg aga aag gac cgt cca cct cta gtg ttt tac tgg att cca 192  
 Tyr Ser Leu Arg Lys Asp Arg Pro Pro Leu Val Phe Tyr Trp Ile Pro  
 50 55 60

tgg gtc ggt agt gct gtt gtg tac ggt atg aag cca tac gag ttt ttc 240  
 Trp Val Gly Ser Ala Val Val Tyr Gly Met Lys Pro Tyr Glu Phe Phe  
 65 70 75 80

gaa gaa tgt caa aag aaa tac ggt gat att ttt tca ttc gtt ttg tta 288  
 Glu Glu Cys Gln Lys Lys Tyr Gly Asp Ile Phe Ser Phe Val Leu Leu  
 85 90 95

gga aga gtc atg act gtg tat tta gga cca aag ggt cac gaa ttt gtc 336  
 Gly Arg Val Met Thr Val Tyr Leu Gly Pro Lys Gly His Glu Phe Val  
 100 105 110

ttc aac gct aag ttg gca gat gtt tca gca gaa gct gct tac gct cat 384  
 Phe Asn Ala Lys Leu Ala Asp Val Ser Ala Glu Ala Tyr Ala His  
 115 120 125

ttg act act cca gtt ttc ggt aaa ggt gtt att tac gat tgt cca aat 432  
 Leu Thr Thr Pro Val Phe Gly Lys Gly Val Ile Tyr Asp Cys Pro Asn  
 130 135 140

tct aga ttg atg gag caa aag aag ttt gtt aag ggt gct cta acc aaa 480  
 Ser Arg Leu Met Glu Gln Lys Lys Phe Val Lys Gly Ala Leu Thr Lys  
 145 150 155 160

gaa gcc ttc aag agc tac gtt cca ttg att gct gaa gaa gtg tac aag 528  
 Glu Ala Phe Lys Ser Tyr Val Pro Leu Ile Ala Glu Glu Val Tyr Lys  
 165 170 175

tac ttc aga gac tcc aaa aac ttc cgt ttg aat gaa aga act act ggt 576  
 Tyr Phe Arg Asp Ser Lys Asn Phe Arg Leu Asn Glu Arg Thr Thr Gly

180	185	190	
act att gac gtg atg gtt act caa cct gaa atg act att ttc acc gct 624 Thr Ile Asp Val Met Val Thr Gln Pro Glu Met Thr Ile Phe Thr Ala 195 200 205			
tca aga tca tta ttg ggt aag gaa atg aga gca aaa ttg gat acc gat 672 Ser Arg Ser Leu Leu Gly Lys Glu Met Arg Ala Lys Leu Asp Thr Asp 210 215 220			
ttt gct tac ttg tac agt gat ttg gat aag ggt ttc act cca atc aac 720 Phe Ala Tyr Leu Tyr Ser Asp Leu Asp Lys Gly Phe Thr Pro Ile Asn 225 230 235 240			
ttc gtc ttc cct aac tta cca ttg gaa cac tat aga aag aga gat cac 768 Phe Val Phe Pro Asn Leu Pro Leu Glu His Tyr Arg Lys Arg Asp His 245 250 255			
gct caa aag gct atc tcc ggt act tac atg tct ttg att aag gaa aga 816 Ala Gln Lys Ala Ile Ser Gly Thr Tyr Met Ser Leu Ile Lys Glu Arg 260 265 270			
aga aag aac aac gac att caa gac aga gat ttg atc gat tcc ttg atg 864 Arg Lys Asn Asn Asp Ile Gln Asp Arg Asp Leu Ile Asp Ser Leu Met 275 280 285			
aag aac tct acc tac aag gat ggt gtg aag atg act gat caa gaa atc 912 Lys Asn Ser Thr Tyr Lys Asp Gly Val Lys Met Thr Asp Gln Glu Ile 290 295 300			
gct aac ttg tta att ggt gtc tta atg ggt ggt caa cat act tct gct 960 Ala Asn Leu Leu Ile Gly Val Leu Met Gly Gly Gln His Thr Ser Ala 305 310 315 320			
gcc act tct gct tgg att ttg ttg cac ttg gct gaa aga cca gat gtc 1008 Ala Thr Ser Ala Trp Ile Leu Leu His Leu Ala Glu Arg Pro Asp Val 325 330 335			
caa caa gaa ttg tac gaa gaa caa atg cgt gtt ttg gat ggt ggt aag 1056 Gln Gln Glu Leu Tyr Glu Glu Gln Met Arg Val Leu Asp Gly Gly Lys 340 345 350			
aag gaa ttg acc tac gat tta tta caa gaa atg cca ttg ttg aac caa 1104 Lys Glu Leu Thr Tyr Asp Leu Leu Gln Glu Met Pro Leu Leu Asn Gln 355 360 365			
act att aag gaa act cta aga atg cac cat cca ttg cac tct ttg ttc 1152 Thr Ile Lys Glu Thr Leu Arg Met His His Pro Leu His Ser Leu Phe 370 375 380			
cgt aag gtt atg aaa gat atg cac gtt cca aac act tct tat gtc atc 1200 Arg Lys Val Met Lys Asp Met His Val Pro Asn Thr Ser Tyr Val Ile 385 390 395 400			
cca gca ggt tat cac gtt ttg gtt tct cca ggt tac act cat tta aga 1248 Pro Ala Gly Tyr His Val Leu Val Ser Pro Gly Tyr Thr His Leu Arg 405 410 415			

gac gaa tac ttc cct aat gct cac caa ttc aac att cac cgt tgg aac 1296  
 Asp Glu Tyr Phe Pro Asn Ala His Gln Phe Asn Ile His Arg Trp Asn  
 420 425 430

aaa gat tct gcc tcc tct tat tcc gtc ggt gaa gaa gtc gat tac ggt 1344  
 Lys Asp Ser Ala Ser Ser Tyr Ser Val Gly Glu Glu Val Asp Tyr Gly  
 435 440 445

ttc ggt gcc att tct aag ggt gtc agc tct cca tac tta cct ttc ggt 1392  
 Phe Gly Ala Ile Ser Lys Gly Val Ser Ser Pro Tyr Leu Pro Phe Gly  
 450 455 460

ggt ggt aga cac aga tgt atc ggt gaa cac ttt gct tac tgt cag cta 1440  
 Gly Gly Arg His Arg Cys Ile Gly Glu His Phe Ala Tyr Cys Gln Leu  
 465 470 475 480

ggt gtt cta atg tcc att ttt atc aga aca tta aaa tgg cat tac cca 1488  
 Gly Val Leu Met Ser Ile Phe Ile Arg Thr Leu Lys Trp His Tyr Pro  
 485 490 495

gag ggt aag acc gtt cca cct cct gac ttt aca tct atg gtt act ctt 1536  
 Glu Gly Lys Thr Val Pro Pro Pro Asp Phe Thr Ser Met Val Thr Leu  
 500 505 510

cca acc ggt cca gcc aag atc atc tgg gaa aag aga aat cca gaa caa 1584  
 Pro Thr Gly Pro Ala Lys Ile Ile Trp Glu Lys Arg Asn Pro Glu Gln  
 515 520 525

aag atc taa 1593  
 Lys Ile  
 530

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 530

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 26

Met Ser Ala Thr Lys Ser Ile Val Gly Glu Ala Leu Glu Tyr Val Asn  
 1 5 10 15

Ile Gly Leu Ser His Phe Leu Ala Leu Pro Leu Ala Gln Arg Ile Ser  
 20 25 30

Leu Ile Ile Ile Ile Pro Phe Ile Tyr Asn Ile Val Trp Gln Leu Leu  
 35 40 45

Tyr Ser Leu Arg Lys Asp Arg Pro Pro Leu Val Phe Tyr Trp Ile Pro  
 50 55 60

Trp Val Gly Ser Ala Val Val Tyr Gly Met Lys Pro Tyr Glu Phe Phe  
 65 70 75 80

Glu Glu Cys Gln Lys Lys Tyr Gly Asp Ile Phe Ser Phe Val Leu Leu  
 85 90 95

Gly	Arg	Val	Met	Thr	Val	Tyr	Leu	Gly	Pro	Lys	Gly	His	Glu	Phe	Val
			100					105					110		
Phe	Asn	Ala	Lys	Leu	Ala	Asp	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Ala	Tyr	Ala	His
		115					120					125			
Leu	Thr	Thr	Pro	Val	Phe	Gly	Lys	Gly	Val	Ile	Tyr	Asp	Cys	Pro	Asn
	130					135					140				
Ser	Arg	Leu	Met	Glu	Gln	Lys	Lys	Phe	Val	Lys	Gly	Ala	Leu	Thr	Lys
145					150					155					160
Glu	Ala	Phe	Lys	Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu	Glu	Val	Tyr	Lys
				165					170					175	
Tyr	Phe	Arg	Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Arg	Leu	Asn	Glu	Arg	Thr	Thr	Gly
			180					185					190		
Thr	Ile	Asp	Val	Met	Val	Thr	Gln	Pro	Glu	Met	Thr	Ile	Phe	Thr	Ala
		195					200					205			
Ser	Arg	Ser	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Met	Arg	Ala	Lys	Leu	Asp	Thr	Asp
	210					215					220				
Phe	Ala	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Asp	Leu	Asp	Lys	Gly	Phe	Thr	Pro	Ile	Asn
225					230					235					240
Phe	Val	Phe	Pro	Asn	Leu	Pro	Leu	Glu	His	Tyr	Arg	Lys	Arg	Asp	His
				245					250					255	
Ala	Gln	Lys	Ala	Ile	Ser	Gly	Thr	Tyr	Met	Ser	Leu	Ile	Lys	Glu	Arg
			260					265					270		
Arg	Lys	Asn	Asn	Asp	Ile	Gln	Asp	Arg	Asp	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	Met
		275					280					285			
Lys	Asn	Ser	Thr	Tyr	Lys	Asp	Gly	Val	Lys	Met	Thr	Asp	Gln	Glu	Ile
	290					295					300				
Ala	Asn	Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Leu	Met	Gly	Gly	Gln	His	Thr	Ser	Ala
305					310					315					320
Ala	Thr	Ser	Ala	Trp	Ile	Leu	Leu	His	Leu	Ala	Glu	Arg	Pro	Asp	Val
				325					330					335	
Gln	Gln	Glu	Leu	Tyr	Glu	Glu	Gln	Met	Arg	Val	Leu	Asp	Gly	Gly	Lys
			340					345					350		
Lys	Glu	Leu	Thr	Tyr	Asp	Leu	Leu	Gln	Glu	Met	Pro	Leu	Leu	Asn	Gln
		355					360					365			
Thr	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Met	His	His	Pro	Leu	His	Ser	Leu	Phe
	370					375					380				
Arg	Lys	Val	Met	Lys	Asp	Met	His	Val	Pro	Asn	Thr	Ser	Tyr	Val	Ile
385					390					395					400



Pro Ala Gly Tyr His Val Leu Val Ser Pro Gly Tyr Thr His Leu Arg  
405 410 415

Asp Glu Tyr Phe Pro Asn Ala His Gln Phe Asn Ile His Arg Trp Asn  
420 425 430

Lys Asp Ser Ala Ser Ser Tyr Ser Val Gly Glu Glu Val Asp Tyr Gly  
435 440 445

Phe Gly Ala Ile Ser Lys Gly Val Ser Ser Pro Tyr Leu Pro Phe Gly  
450 455 460

Gly Gly Arg His Arg Cys Ile Gly Glu His Phe Ala Tyr Cys Gln Leu  
465 470 475 480

Gly Val Leu Met Ser Ile Phe Ile Arg Thr Leu Lys Trp His Tyr Pro  
485 490 495

Glu Gly Lys Thr Val Pro Pro Pro Asp Phe Thr Ser Met Val Thr Leu  
500 505 510

Pro Thr Gly Pro Ala Lys Ile Ile Trp Glu Lys Arg Asn Pro Glu Gln  
515 520 525

Lys Ile  
530

<210> 27

<211> 1491

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1491)

<400> 27

atg tct gct gtt aac gtt gca cct gaa ttg att aat gcc gac aac aca 48  
Met Ser Ala Val Asn Val Ala Pro Glu Leu Ile Asn Ala Asp Asn Thr  
1 5 10 15

att acc tac gat gcg att gtc atc ggt gct ggt gtt atc ggt cca tgt 96  
Ile Thr Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ala Gly Val Ile Gly Pro Cys  
20 25 30

gtt gct act ggt cta gca aga aag ggt aag aaa gtt ctt atc gta gaa 144  
Val Ala Thr Gly Leu Ala Arg Lys Gly Lys Lys Val Leu Ile Val Glu  
35 40 45

cgt gac tgg gct atg cct gat aga att gtt ggt gaa ttg atg caa cca 192  
Arg Asp Trp Ala Met Pro Asp Arg Ile Val Gly Glu Leu Met Gln Pro  
50 55 60

ggt ggt gtt aga gca ttg aga agt ctg ggt atg att caa tct atc aac 240  
Gly Gly Val Arg Ala Leu Arg Ser Leu Gly Met Ile Gln Ser Ile Asn

65						70						75						80	
aac atc gaa gca tat cct gtt acc ggt tat acc gtc ttt ttc aac ggc						85						90						95	288
Asn Ile Glu Ala Tyr Pro Val Thr Gly Tyr Thr Val Phe Phe Asn Gly																			
gaa caa gtt gat att cca tac cct tac aag gcc gat atc cct aaa gtt						100						105						110	336
Glu Gln Val Asp Ile Pro Tyr Pro Tyr Lys Ala Asp Ile Pro Lys Val																			
gaa aaa ttg aag gac ttg gtc aaa gat ggt aat gac aag gtc ttg gaa						115						120						125	384
Glu Lys Leu Lys Asp Leu Val Lys Asp Gly Asn Asp Lys Val Leu Glu																			
gac agc act att cac atc aag gat tac gaa gat gat gaa aga gaa agg						130						135						140	432
Asp Ser Thr Ile His Ile Lys Asp Tyr Glu Asp Asp Glu Arg Glu Arg																			
ggt gtt gct ttt gtt cat ggt aga ttc ttg aac aac ttg aga aac att						145						150						155	480
Gly Val Ala Phe Val His Gly Arg Phe Leu Asn Asn Leu Arg Asn Ile																		160	
act gct caa gag cca aat gtt act aga gtg caa ggt aac tgt att gag						165						170						175	528
Thr Ala Gln Glu Pro Asn Val Thr Arg Val Gln Gly Asn Cys Ile Glu																			
ata ttg aag gat gaa aag aat gag gtt gtt ggt gcc aag gtt gac att						180						185						190	576
Ile Leu Lys Asp Glu Lys Asn Glu Val Val Gly Ala Lys Val Asp Ile																			
gat ggc cgt ggc aag gtg gaa ttc aaa gcc cac ttg aca ttt atc tgt						195						200						205	624
Asp Gly Arg Gly Lys Val Glu Phe Lys Ala His Leu Thr Phe Ile Cys																			
gac ggt atc ttt tca cgt ttc aga aag gaa ttg cac cca gac cat gtt						210						215						220	672
Asp Gly Ile Phe Ser Arg Phe Arg Lys Glu Leu His Pro Asp His Val																			
cca act gtc ggt tct tct ttt gtc ggt atg tct ttg ttc aat gct aag						225						230						235	720
Pro Thr Val Gly Ser Ser Phe Val Gly Met Ser Leu Phe Asn Ala Lys																		240	
aat cct gct cct atg cac ggt cac gtt att ctt ggt agt gat cat atg						245						250						255	768
Asn Pro Ala Pro Met His Gly His Val Ile Leu Gly Ser Asp His Met																			
cca atc ttg gtt tac caa atc agt cca gaa gaa aca aga atc ctt tgt						260						265						270	816
Pro Ile Leu Val Tyr Gln Ile Ser Pro Glu Glu Thr Arg Ile Leu Cys																			
gct tac aac tct cca aag gtc cca gct gat atc aag agt tgg atg att						275						280						285	864
Ala Tyr Asn Ser Pro Lys Val Pro Ala Asp Ile Lys Ser Trp Met Ile																			
aag gat gtc caa cct ttc att cca aag agt cta cgt cct tca ttt gat						290						295						300	912
Lys Asp Val Gln Pro Phe Ile Pro Lys Ser Leu Arg Pro Ser Phe Asp																			

```

gaa gcc gtc agc caa ggt aaa ttt aga gct atg cca aac tcc tac ttg      960
Glu Ala Val Ser Gln Gly Lys Phe Arg Ala Met Pro Asn Ser Tyr Leu
305                      310                      315                      320

cca gct aga caa aac gac gtc act ggt atg tgt gtt atc ggt gac gct      1008
Pro Ala Arg Gln Asn Asp Val Thr Gly Met Cys Val Ile Gly Asp Ala
                      325                      330                      335

cta aat atg aga cat cca ttg act ggt ggt ggt atg act gtc ggt ttg      1056
Leu Asn Met Arg His Pro Leu Thr Gly Gly Gly Met Thr Val Gly Leu
                      340                      345                      350

cat gat gtt gtc ttg ttg att aag aaa ata ggt gac cta gac ttc agc      1104
His Asp Val Val Leu Leu Ile Lys Lys Ile Gly Asp Leu Asp Phe Ser
                      355                      360                      365

gac cgt gaa aag gtt ttg gat gaa tta cta gac tac cat ttc gaa aga      1152
Asp Arg Glu Lys Val Leu Asp Glu Leu Leu Asp Tyr His Phe Glu Arg
                      370                      375                      380

aag agt tac gat tcc gtt att aac gtt ttg tca gtg gct ttg tat tct      1200
Lys Ser Tyr Asp Ser Val Ile Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Tyr Ser
385                      390                      395                      400

ttg ttc gct gct gac agc gat aac ttg aag gca tta caa aaa ggt tgt      1248
Leu Phe Ala Ala Asp Ser Asp Asn Leu Lys Ala Leu Gln Lys Gly Cys
                      405                      410                      415

ttc aaa tat ttc caa aga ggt ggc gat tgt gtc aac aaa ccc gtt gaa      1296
Phe Lys Tyr Phe Gln Arg Gly Gly Asp Cys Val Asn Lys Pro Val Glu
                      420                      425                      430

ttt ctg tct ggt gtc ttg cca aag cct ttg caa ttg acc agg gtt ttc      1344
Phe Leu Ser Gly Val Leu Pro Lys Pro Leu Gln Leu Thr Arg Val Phe
                      435                      440                      445

ttc gct gtc gct ttt tac acc att tac ttg aac atg gaa gaa cgt ggt      1392
Phe Ala Val Ala Phe Tyr Thr Ile Tyr Leu Asn Met Glu Glu Arg Gly
                      450                      455                      460

ttc ttg gga tta cca atg gct tta ttg gaa ggt att atg att ttg atc      1440
Phe Leu Gly Leu Pro Met Ala Leu Leu Glu Gly Ile Met Ile Leu Ile
465                      470                      475                      480

aca gct att aga gta ttc acc cca ttt ttg ttt ggt gag ttg att ggt      1488
Thr Ala Ile Arg Val Phe Thr Pro Phe Leu Phe Gly Glu Leu Ile Gly
                      485                      490                      495

taa                                                                1491

```

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 496

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 28

```

Met Ser Ala Val Asn Val Ala Pro Glu Leu Ile Asn Ala Asp Asn Thr
 1              5              10              15

Ile Thr Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ala Gly Val Ile Gly Pro Cys
      20              25              30

Val Ala Thr Gly Leu Ala Arg Lys Gly Lys Lys Val Leu Ile Val Glu
      35              40              45

Arg Asp Trp Ala Met Pro Asp Arg Ile Val Gly Glu Leu Met Gln Pro
      50              55              60

Gly Gly Val Arg Ala Leu Arg Ser Leu Gly Met Ile Gln Ser Ile Asn
      65              70              75              80

Asn Ile Glu Ala Tyr Pro Val Thr Gly Tyr Thr Val Phe Phe Asn Gly
      85              90              95

Glu Gln Val Asp Ile Pro Tyr Pro Tyr Lys Ala Asp Ile Pro Lys Val
      100              105              110

Glu Lys Leu Lys Asp Leu Val Lys Asp Gly Asn Asp Lys Val Leu Glu
      115              120              125

Asp Ser Thr Ile His Ile Lys Asp Tyr Glu Asp Asp Glu Arg Glu Arg
      130              135              140

Gly Val Ala Phe Val His Gly Arg Phe Leu Asn Asn Leu Arg Asn Ile
      145              150              155              160

Thr Ala Gln Glu Pro Asn Val Thr Arg Val Gln Gly Asn Cys Ile Glu
      165              170              175

Ile Leu Lys Asp Glu Lys Asn Glu Val Val Gly Ala Lys Val Asp Ile
      180              185              190

Asp Gly Arg Gly Lys Val Glu Phe Lys Ala His Leu Thr Phe Ile Cys
      195              200              205

Asp Gly Ile Phe Ser Arg Phe Arg Lys Glu Leu His Pro Asp His Val
      210              215              220

Pro Thr Val Gly Ser Ser Phe Val Gly Met Ser Leu Phe Asn Ala Lys
      225              230              235              240

Asn Pro Ala Pro Met His Gly His Val Ile Leu Gly Ser Asp His Met
      245              250              255

Pro Ile Leu Val Tyr Gln Ile Ser Pro Glu Glu Thr Arg Ile Leu Cys
      260              265              270

Ala Tyr Asn Ser Pro Lys Val Pro Ala Asp Ile Lys Ser Trp Met Ile
      275              280              285

Lys Asp Val Gln Pro Phe Ile Pro Lys Ser Leu Arg Pro Ser Phe Asp

```

290	295	300
Glu Ala Val Ser Gln Gly Lys Phe Arg Ala Met Pro Asn Ser Tyr Leu 305 310 315 320		
Pro Ala Arg Gln Asn Asp Val Thr Gly Met Cys Val Ile Gly Asp Ala 325 330 335		
Leu Asn Met Arg His Pro Leu Thr Gly Gly Gly Met Thr Val Gly Leu 340 345 350		
His Asp Val Val Leu Leu Ile Lys Lys Ile Gly Asp Leu Asp Phe Ser 355 360 365		
Asp Arg Glu Lys Val Leu Asp Glu Leu Leu Asp Tyr His Phe Glu Arg 370 375 380		
Lys Ser Tyr Asp Ser Val Ile Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Tyr Ser 385 390 395 400		
Leu Phe Ala Ala Asp Ser Asp Asn Leu Lys Ala Leu Gln Lys Gly Cys 405 410 415		
Phe Lys Tyr Phe Gln Arg Gly Gly Asp Cys Val Asn Lys Pro Val Glu 420 425 430		
Phe Leu Ser Gly Val Leu Pro Lys Pro Leu Gln Leu Thr Arg Val Phe 435 440 445		
Phe Ala Val Ala Phe Tyr Thr Ile Tyr Leu Asn Met Glu Glu Arg Gly 450 455 460		
Phe Leu Gly Leu Pro Met Ala Leu Leu Glu Gly Ile Met Ile Leu Ile 465 470 475 480		
Thr Ala Ile Arg Val Phe Thr Pro Phe Leu Phe Gly Glu Leu Ile Gly 485 490 495		

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 1335

&lt;212&gt; DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1335)

&lt;400&gt; 29

atg gga aag cta tta caa ttg gca ttg cat ccg gtc gag atg aag gca	48
Met Gly Lys Leu Leu Gln Leu Ala Leu His Pro Val Glu Met Lys Ala	
1 5 10 15	

gct ttg aag ctg aag ttt tgc aga aca ccg cta ttc tcc atc tat gat	96
Ala Leu Lys Leu Lys Phe Cys Arg Thr Pro Leu Phe Ser Ile Tyr Asp	
20 25 30	

cag	tcc	acg	tct	cca	tat	ctc	ttg	cac	tgt	ttc	gaa	ctg	ttg	aac	ttg	144
Gln	Ser	Thr	Ser	Pro	Tyr	Leu	Leu	His	Cys	Phe	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	
		35					40					45				
acc	tcc	aga	tcg	ttt	gct	gct	gtg	atc	aga	gag	ctg	cat	cca	gaa	ttg	192
Thr	Ser	Arg	Ser	Phe	Ala	Ala	Val	Ile	Arg	Glu	Leu	His	Pro	Glu	Leu	
		50				55					60					
aga	aac	tgt	gtt	act	ctc	ttt	tat	ttg	att	tta	agg	gct	ttg	gat	acc	240
Arg	Asn	Cys	Val	Thr	Leu	Phe	Tyr	Leu	Ile	Leu	Arg	Ala	Leu	Asp	Thr	
	65					70					75				80	
atc	gaa	gac	gat	atg	tcc	atc	gaa	cac	gat	ttg	aaa	att	gac	ttg	ttg	288
Ile	Glu	Asp	Asp	Met	Ser	Ile	Glu	His	Asp	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Leu	
				85					90					95		
cgt	cac	ttc	cac	gag	aaa	ttg	ttg	tta	act	aaa	tgg	agt	ttc	gac	gga	336
Arg	His	Phe	His	Glu	Lys	Leu	Leu	Leu	Thr	Lys	Trp	Ser	Phe	Asp	Gly	
			100					105						110		
aat	gcc	ccc	gat	gtg	aag	gac	aga	gcc	gtt	ttg	aca	gat	ttc	gaa	tcg	384
Asn	Ala	Pro	Asp	Val	Lys	Asp	Arg	Ala	Val	Leu	Thr	Asp	Phe	Glu	Ser	
		115					120					125				
att	ctt	att	gaa	ttc	cac	aaa	ttg	aaa	cca	gaa	tat	caa	gaa	gtc	atc	432
Ile	Leu	Ile	Glu	Phe	His	Lys	Leu	Lys	Pro	Glu	Tyr	Gln	Glu	Val	Ile	
	130					135					140					
aag	gag	atc	acc	gag	aaa	atg	ggt	aat	ggt	atg	gcc	gac	tac	atc	tta	480
Lys	Glu	Ile	Thr	Glu	Lys	Met	Gly	Asn	Gly	Met	Ala	Asp	Tyr	Ile	Leu	
	145					150				155					160	
gat	gaa	aat	tac	aac	ttg	aat	ggg	ttg	caa	acc	gtc	cac	gac	tac	gac	528
Asp	Glu	Asn	Tyr	Asn	Leu	Asn	Gly	Leu	Gln	Thr	Val	His	Asp	Tyr	Asp	
				165					170					175		
gtg	tac	tgt	cac	tac	gta	gct	ggt	ttg	gtc	ggt	gat	ggt	ttg	acc	cgt	576
Val	Tyr	Cys	His	Tyr	Val	Ala	Gly	Leu	Val	Gly	Asp	Gly	Leu	Thr	Arg	
			180					185					190			
ttg	att	gtc	att	gcc	aag	ttt	gcc	aac	gaa	tct	ttg	tat	tct	aat	gag	624
Leu	Ile	Val	Ile	Ala	Lys	Phe	Ala	Asn	Glu	Ser	Leu	Tyr	Ser	Asn	Glu	
		195					200					205				
caa	ttg	tat	gaa	agc	atg	ggt	ctt	ttc	cta	caa	aaa	acc	aac	atc	atc	672
Gln	Leu	Tyr	Glu	Ser	Met	Gly	Leu	Phe	Leu	Gln	Lys	Thr	Asn	Ile	Ile	
	210					215					220					
aga	gat	tac	aat	gaa	gat	ttg	gtc	gat	ggt	aga	tcc	ttc	tgg	ccc	aag	720
Arg	Asp	Tyr	Asn	Glu	Asp	Leu	Val	Asp	Gly	Arg	Ser	Phe	Trp	Pro	Lys	
	225				230					235					240	
gaa	atc	tgg	tca	caa	tac	gct	cct	cag	ttg	aag	gac	ttc	atg	aaa	cct	768
Glu	Ile	Trp	Ser	Gln	Tyr	Ala	Pro	Gln	Leu	Lys	Asp	Phe	Met	Lys	Pro	
				245					250					255		
gaa	aac	gaa	caa	ctg	ggg	ttg	gac	tgt	ata	aac	cac	ctc	gtc	tta	aac	816

Glu	Asn	Glu	Gln	Leu	Gly	Leu	Asp	Cys	Ile	Asn	His	Leu	Val	Leu	Asn	
			260					265					270			
gca	ttg	agt	cat	gtt	atc	gat	gtg	ttg	act	tat	ttg	gcc	ggt	atc	cac	864
Ala	Leu	Ser	His	Val	Ile	Asp	Val	Leu	Thr	Tyr	Leu	Ala	Gly	Ile	His	
		275					280					285				
gag	caa	tcc	act	ttc	caa	ttt	tgt	gcc	att	ccc	caa	gtt	atg	gcc	att	912
Glu	Gln	Ser	Thr	Phe	Gln	Phe	Cys	Ala	Ile	Pro	Gln	Val	Met	Ala	Ile	
	290					295				300						
gca	acc	ttg	gct	ttg	gta	ttc	aac	aac	cgt	gaa	gtg	cta	cat	ggc	aat	960
Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Phe	Asn	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	His	Gly	Asn	
305					310					315					320	
gta	aag	att	cgt	aag	ggt	act	acc	tgc	tat	tta	att	ttg	aaa	tca	agg	1008
Val	Lys	Ile	Arg	Lys	Gly	Thr	Thr	Cys	Tyr	Leu	Ile	Leu	Lys	Ser	Arg	
				325				330						335		
act	ttg	cgt	ggc	tgt	gtc	gag	att	ttt	gac	tat	tac	tta	cgt	gat	atc	1056
Thr	Leu	Arg	Gly	Cys	Val	Glu	Ile	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Asp	Ile	
			340					345					350			
aaa	tct	aaa	ttg	gct	gtg	caa	gat	cca	aat	ttc	tta	aaa	ttg	aac	att	1104
Lys	Ser	Lys	Leu	Ala	Val	Gln	Asp	Pro	Asn	Phe	Leu	Lys	Leu	Asn	Ile	
		355					360					365				
caa	atc	tcc	aag	atc	gaa	cag	ttt	atg	gaa	gaa	atg	tac	cag	gat	aaa	1152
Gln	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu	Gln	Phe	Met	Glu	Glu	Met	Tyr	Gln	Asp	Lys	
	370					375					380					
tta	cct	cct	aac	gtg	aag	cca	aat	gaa	act	cca	att	ttc	ttg	aaa	gtt	1200
Leu	Pro	Pro	Asn	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Pro	Ile	Phe	Leu	Lys	Val	
385					390					395					400	
aaa	gaa	aga	tcc	aga	tac	gat	gat	gaa	ttg	gtt	cca	acc	caa	caa	gaa	1248
Lys	Glu	Arg	Ser	Arg	Tyr	Asp	Asp	Glu	Leu	Val	Pro	Thr	Gln	Gln	Glu	
				405				410					415			
gaa	gag	tac	aag	ttc	aat	atg	gtt	tta	tct	atc	atc	ttg	tcc	gtt	ctt	1296
Glu	Glu	Tyr	Lys	Phe	Asn	Met	Val	Leu	Ser	Ile	Ile	Leu	Ser	Val	Leu	
			420					425					430			
ctt	ggg	ttt	tat	tat	ata	tac	act	tta	cac	aga	gcg	tga				1335
Leu	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Thr	Leu	His	Arg	Ala					
		435					440					445				

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 444

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 30

Met Gly Lys Leu Leu Gln Leu Ala Leu His Pro Val Glu Met Lys Ala

1

5

10

15

Ala Leu Lys Leu Lys Phe Cys Arg Thr Pro Leu Phe Ser Ile Tyr Asp  
 20 25 30

Gln Ser Thr Ser Pro Tyr Leu Leu His Cys Phe Glu Leu Leu Asn Leu  
 35 40 45

Thr Ser Arg Ser Phe Ala Ala Val Ile Arg Glu Leu His Pro Glu Leu  
 50 55 60

Arg Asn Cys Val Thr Leu Phe Tyr Leu Ile Leu Arg Ala Leu Asp Thr  
 65 70 75 80

Ile Glu Asp Asp Met Ser Ile Glu His Asp Leu Lys Ile Asp Leu Leu  
 85 90 95

Arg His Phe His Glu Lys Leu Leu Leu Thr Lys Trp Ser Phe Asp Gly  
 100 105 110

Asn Ala Pro Asp Val Lys Asp Arg Ala Val Leu Thr Asp Phe Glu Ser  
 115 120 125

Ile Leu Ile Glu Phe His Lys Leu Lys Pro Glu Tyr Gln Glu Val Ile  
 130 135 140

Lys Glu Ile Thr Glu Lys Met Gly Asn Gly Met Ala Asp Tyr Ile Leu  
 145 150 155 160

Asp Glu Asn Tyr Asn Leu Asn Gly Leu Gln Thr Val His Asp Tyr Asp  
 165 170 175

Val Tyr Cys His Tyr Val Ala Gly Leu Val Gly Asp Gly Leu Thr Arg  
 180 185 190

Leu Ile Val Ile Ala Lys Phe Ala Asn Glu Ser Leu Tyr Ser Asn Glu  
 195 200 205

Gln Leu Tyr Glu Ser Met Gly Leu Phe Leu Gln Lys Thr Asn Ile Ile  
 210 215 220

Arg Asp Tyr Asn Glu Asp Leu Val Asp Gly Arg Ser Phe Trp Pro Lys  
 225 230 235 240

Glu Ile Trp Ser Gln Tyr Ala Pro Gln Leu Lys Asp Phe Met Lys Pro  
 245 250 255

Glu Asn Glu Gln Leu Gly Leu Asp Cys Ile Asn His Leu Val Leu Asn  
 260 265 270

Ala Leu Ser His Val Ile Asp Val Leu Thr Tyr Leu Ala Gly Ile His  
 275 280 285

Glu Gln Ser Thr Phe Gln Phe Cys Ala Ile Pro Gln Val Met Ala Ile  
 290 295 300

Ala Thr Leu Ala Leu Val Phe Asn Asn Arg Glu Val Leu His Gly Asn  
 305 310 315 320



Val Lys Ile Arg Lys Gly Thr Thr Cys Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Arg  
 325 330 335

Thr Leu Arg Gly Cys Val Glu Ile Phe Asp Tyr Tyr Leu Arg Asp Ile  
 340 345 350

Lys Ser Lys Leu Ala Val Gln Asp Pro Asn Phe Leu Lys Leu Asn Ile  
 355 360 365

Gln Ile Ser Lys Ile Glu Gln Phe Met Glu Glu Met Tyr Gln Asp Lys  
 370 375 380

Leu Pro Pro Asn Val Lys Pro Asn Glu Thr Pro Ile Phe Leu Lys Val  
 385 390 395 400

Lys Glu Arg Ser Arg Tyr Asp Asp Glu Leu Val Pro Thr Gln Gln Glu  
 405 410 415

Glu Glu Tyr Lys Phe Asn Met Val Leu Ser Ile Ile Leu Ser Val Leu  
 420 425 430

Leu Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Thr Leu His Arg Ala  
 435 440

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 1929

&lt;212&gt; DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1929)

&lt;400&gt; 31

atg gac aag aag aag gat cta ctg gag aac gaa caa ttt ctc cgc atc 48  
 Met Asp Lys Lys Lys Asp Leu Leu Glu Asn Glu Gln Phe Leu Arg Ile  
 1 5 10 15

caa aag ctc aac gct gcc gat gcg ggc aaa aga caa tct ata aca gtg 96  
 Gln Lys Leu Asn Ala Ala Asp Ala Gly Lys Arg Gln Ser Ile Thr Val  
 20 25 30

gac gac gag ggc gaa cta tat ggg tta gac acc tcc ggc aac tca cca 144  
 Asp Asp Glu Gly Glu Leu Tyr Gly Leu Asp Thr Ser Gly Asn Ser Pro  
 35 40 45

gcc aat gaa cac aca gct acc aca att aca cag aat cac agc gtg gtg 192  
 Ala Asn Glu His Thr Ala Thr Thr Ile Thr Gln Asn His Ser Val Val  
 50 55 60

gcc tca aac gga gac gtc gca ttc atc cca gga act gct acc gaa ggc 240  
 Ala Ser Asn Gly Asp Val Ala Phe Ile Pro Gly Thr Ala Thr Glu Gly  
 65 70 75 80

aat aca gag att gta act gaa gaa gtg att gag acc gat gat aac atg 288  
 Asn Thr Glu Ile Val Thr Glu Glu Val Ile Glu Thr Asp Asp Asn Met

85										90					95					
ttc aag acc cat gtg aag act tta agc tcc aaa gag aag gca cgg tat	336																			
Phe Lys Thr His Val Lys Thr Leu Ser Ser Lys Glu Lys Ala Arg Tyr																				
100 105 110																				
agg caa ggg tcc tct aac ttt ata tcg tat ttc gat gat atg tca ttt	384																			
Arg Gln Gly Ser Ser Asn Phe Ile Ser Tyr Phe Asp Asp Met Ser Phe																				
115 120 125																				
gaa cac agg ccc agt ata tta gat ggg tca gtt aac gag ccc ttc aag	432																			
Glu His Arg Pro Ser Ile Leu Asp Gly Ser Val Asn Glu Pro Phe Lys																				
130 135 140																				
acc aaa ttc gtg gga cct act tta gaa aag gag atc aga aga agg gag	480																			
Thr Lys Phe Val Gly Pro Thr Leu Glu Lys Glu Ile Arg Arg Arg Glu																				
145 150 155 160																				
aaa gag cta atg gcc atg cgc aaa aat tta cac cac cgc aag tcc tcc	528																			
Lys Glu Leu Met Ala Met Arg Lys Asn Leu His His Arg Lys Ser Ser																				
165 170 175																				
cca gat gct gtc gac tca gta ggg aaa aat gat ggc gcc gcc cca act	576																			
Pro Asp Ala Val Asp Ser Val Gly Lys Asn Asp Gly Ala Ala Pro Thr																				
180 185 190																				
act gtt cca act gcc gcc acc tca gaa acg gtg gtc acc gtt gaa acc	624																			
Thr Val Pro Thr Ala Ala Thr Ser Glu Thr Val Val Thr Val Glu Thr																				
195 200 205																				
acc ata att tca tcc aat ttc tcc ggg ttg tac gtg gcg ttt tgg atg	672																			
Thr Ile Ile Ser Ser Asn Phe Ser Gly Leu Tyr Val Ala Phe Trp Met																				
210 215 220																				
gct att gca ttt ggt gct gtc aag gct tta ata gac tat tat tac cag	720																			
Ala Ile Ala Phe Gly Ala Val Lys Ala Leu Ile Asp Tyr Tyr Tyr Gln																				
225 230 235 240																				
cat aat ggt agc ttc aag gat tcg gag atc ttg aaa ttt atg act acg	768																			
His Asn Gly Ser Phe Lys Asp Ser Glu Ile Leu Lys Phe Met Thr Thr																				
245 250 255																				
aat ttg ttc act gtg gca tcc gta gat ctt ttg atg tat ttg agc act	816																			
Asn Leu Phe Thr Val Ala Ser Val Asp Leu Leu Met Tyr Leu Ser Thr																				
260 265 270																				
tat ttt gtc gtt gga ata caa tac tta tgc aag tgg ggg gtc ttg aaa	864																			
Tyr Phe Val Val Gly Ile Gln Tyr Leu Cys Lys Trp Gly Val Leu Lys																				
275 280 285																				
tgg ggc act acc ggc tgg atc ttc acc tca att tac gag ttt ttg ttt	912																			
Trp Gly Thr Thr Gly Trp Ile Phe Thr Ser Ile Tyr Glu Phe Leu Phe																				
290 295 300																				
gtt atc ttc tac atg tat tta aca gaa aac atc cta aaa cta cac tgg	960																			
Val Ile Phe Tyr Met Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Leu Lys Leu His Trp																				
305 310 315 320																				

ctg tcc aag atc ttc ctt ttt ttg cat tct tta gtt tta ttg atg aaa	1008
Leu Ser Lys Ile Phe Leu Phe Leu His Ser Leu Val Leu Leu Met Lys	
325 330 335	
atg cat tct ttc gcc ttc tac aat ggc tat cta tgg ggt ata aag gaa	1056
Met His Ser Phe Ala Phe Tyr Asn Gly Tyr Leu Trp Gly Ile Lys Glu	
340 345 350	
gaa cta caa ttt tcc aaa agc gct ctt gcc aaa tac aag gat tct ata	1104
Glu Leu Gln Phe Ser Lys Ser Ala Leu Ala Lys Tyr Lys Asp Ser Ile	
355 360 365	
aat gat cca aaa gtt att ggt gct ctt gag aaa agc tgt gag ttt tgt	1152
Asn Asp Pro Lys Val Ile Gly Ala Leu Glu Lys Ser Cys Glu Phe Cys	
370 375 380	
agt ttt gaa ttg agc tct cag tct tta agc gac caa act caa aaa ttc	1200
Ser Phe Glu Leu Ser Ser Gln Ser Leu Ser Asp Gln Thr Gln Lys Phe	
385 390 395 400	
ccc aac aat atc agt gca aaa agc ttt ttt tgg ttc acc atg ttt cca	1248
Pro Asn Asn Ile Ser Ala Lys Ser Phe Phe Trp Phe Thr Met Phe Pro	
405 410 415	
acc cta att tac caa att gaa tat cca aga act aag gaa atc aga tgg	1296
Thr Leu Ile Tyr Gln Ile Glu Tyr Pro Arg Thr Lys Glu Ile Arg Trp	
420 425 430	
agc tac gta tta gaa aag atc tgc gcc atc ttc ggt acc att ttc tta	1344
Ser Tyr Val Leu Glu Lys Ile Cys Ala Ile Phe Gly Thr Ile Phe Leu	
435 440 445	
atg atg ata gat gct caa atc ttg atg tat cct gta gca atg aga gca	1392
Met Met Ile Asp Ala Gln Ile Leu Met Tyr Pro Val Ala Met Arg Ala	
450 455 460	
ttg gct gtg cgc aat tct gaa tgg act ggt ata ttg gat aga tta ttg	1440
Leu Ala Val Arg Asn Ser Glu Trp Thr Gly Ile Leu Asp Arg Leu Leu	
465 470 475 480	
aaa tgg gtt gga ttg ctc gtt gat atc gtc cca ggg ttt atc gtg atg	1488
Lys Trp Val Gly Leu Leu Val Asp Ile Val Pro Gly Phe Ile Val Met	
485 490 495	
tac atc ttg gac ttc tat ttg att tgg gat gcc att ttg aac tgt gtg	1536
Tyr Ile Leu Asp Phe Tyr Leu Ile Trp Asp Ala Ile Leu Asn Cys Val	
500 505 510	
gct gaa ttg aca aga ttt ggc gac aga tat ttc tac ggt gac tgg tgg	1584
Ala Glu Leu Thr Arg Phe Gly Asp Arg Tyr Phe Tyr Gly Asp Trp Trp	
515 520 525	
aat tgt gtt agt tgg gca gac ttc agt aga att tgg aac atc cca gtg	1632
Asn Cys Val Ser Trp Ala Asp Phe Ser Arg Ile Trp Asn Ile Pro Val	
530 535 540	

cat aag ttt ttg tta aga cat gtt tac cat agt tca atg agt tca ttc 1680  
 His Lys Phe Leu Leu Arg His Val Tyr His Ser Ser Met Ser Ser Phe  
 545 550 555 560

aaa ttg aac aag agt caa gca act ttg atg acc ttt ttc tta agt tcc 1728  
 Lys Leu Asn Lys Ser Gln Ala Thr Leu Met Thr Phe Phe Leu Ser Ser  
 565 570 575

gtc gtt cat gaa tta gca atg tac gtt atc ttc aag aaa ttg agg ttt 1776  
 Val Val His Glu Leu Ala Met Tyr Val Ile Phe Lys Lys Leu Arg Phe  
 580 585 590

tac ttg ttc ttc ttc caa atg ctg caa atg cca tta gta gct tta aca 1824  
 Tyr Leu Phe Phe Phe Gln Met Leu Gln Met Pro Leu Val Ala Leu Thr  
 595 600 605

aat act aaa ttc atg agg aac aga acc ata atc gga aat gtt att ttc 1872  
 Asn Thr Lys Phe Met Arg Asn Arg Thr Ile Ile Gly Asn Val Ile Phe  
 610 615 620

tgg ctc ggt atc tgc atg gga cca agt gtc atg tgt acg ttg tac ttg 1920  
 Trp Leu Gly Ile Cys Met Gly Pro Ser Val Met Cys Thr Leu Tyr Leu  
 625 630 635 640

aca ttc taa 1929  
 Thr Phe

<210> 32

<211> 642

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 32

Met Asp Lys Lys Lys Asp Leu Leu Glu Asn Glu Gln Phe Leu Arg Ile  
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Asn Ala Ala Asp Ala Gly Lys Arg Gln Ser Ile Thr Val  
 20 25 30

Asp Asp Glu Gly Glu Leu Tyr Gly Leu Asp Thr Ser Gly Asn Ser Pro  
 35 40 45

Ala Asn Glu His Thr Ala Thr Thr Ile Thr Gln Asn His Ser Val Val  
 50 55 60

Ala Ser Asn Gly Asp Val Ala Phe Ile Pro Gly Thr Ala Thr Glu Gly  
 65 70 75 80

Asn Thr Glu Ile Val Thr Glu Glu Val Ile Glu Thr Asp Asp Asn Met  
 85 90 95

Phe Lys Thr His Val Lys Thr Leu Ser Ser Lys Glu Lys Ala Arg Tyr  
 100 105 110

Arg Gln Gly Ser Ser Asn Phe Ile Ser Tyr Phe Asp Asp Met Ser Phe  
 115 120 125

Glu His Arg Pro Ser Ile Leu Asp Gly Ser Val Asn Glu Pro Phe Lys  
 130 135 140  
 Thr Lys Phe Val Gly Pro Thr Leu Glu Lys Glu Ile Arg Arg Arg Glu  
 145 150 155 160  
 Lys Glu Leu Met Ala Met Arg Lys Asn Leu His His Arg Lys Ser Ser  
 165 170 175  
 Pro Asp Ala Val Asp Ser Val Gly Lys Asn Asp Gly Ala Ala Pro Thr  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Thr Ala Ala Thr Ser Glu Thr Val Val Thr Val Glu Thr  
 195 200 205  
 Thr Ile Ile Ser Ser Asn Phe Ser Gly Leu Tyr Val Ala Phe Trp Met  
 210 215 220  
 Ala Ile Ala Phe Gly Ala Val Lys Ala Leu Ile Asp Tyr Tyr Tyr Gln  
 225 230 235 240  
 His Asn Gly Ser Phe Lys Asp Ser Glu Ile Leu Lys Phe Met Thr Thr  
 245 250 255  
 Asn Leu Phe Thr Val Ala Ser Val Asp Leu Leu Met Tyr Leu Ser Thr  
 260 265 270  
 Tyr Phe Val Val Gly Ile Gln Tyr Leu Cys Lys Trp Gly Val Leu Lys  
 275 280 285  
 Trp Gly Thr Thr Gly Trp Ile Phe Thr Ser Ile Tyr Glu Phe Leu Phe  
 290 295 300  
 Val Ile Phe Tyr Met Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Leu Lys Leu His Trp  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Lys Ile Phe Leu Phe Leu His Ser Leu Val Leu Leu Met Lys  
 325 330 335  
 Met His Ser Phe Ala Phe Tyr Asn Gly Tyr Leu Trp Gly Ile Lys Glu  
 340 345 350  
 Glu Leu Gln Phe Ser Lys Ser Ala Leu Ala Lys Tyr Lys Asp Ser Ile  
 355 360 365  
 Asn Asp Pro Lys Val Ile Gly Ala Leu Glu Lys Ser Cys Glu Phe Cys  
 370 375 380  
 Ser Phe Glu Leu Ser Ser Gln Ser Leu Ser Asp Gln Thr Gln Lys Phe  
 385 390 395 400  
 Pro Asn Asn Ile Ser Ala Lys Ser Phe Phe Trp Phe Thr Met Phe Pro  
 405 410 415  
 Thr Leu Ile Tyr Gln Ile Glu Tyr Pro Arg Thr Lys Glu Ile Arg Trp  
 420 425 430

Ser Tyr Val Leu Glu Lys Ile Cys Ala Ile Phe Gly Thr Ile Phe Leu  
435 440 445

Met Met Ile Asp Ala Gln Ile Leu Met Tyr Pro Val Ala Met Arg Ala  
450 455 460

Leu Ala Val Arg Asn Ser Glu Trp Thr Gly Ile Leu Asp Arg Leu Leu  
465 470 475 480

Lys Trp Val Gly Leu Leu Val Asp Ile Val Pro Gly Phe Ile Val Met  
485 490 495

Tyr Ile Leu Asp Phe Tyr Leu Ile Trp Asp Ala Ile Leu Asn Cys Val  
500 505 510

Ala Glu Leu Thr Arg Phe Gly Asp Arg Tyr Phe Tyr Gly Asp Trp Trp  
515 520 525

Asn Cys Val Ser Trp Ala Asp Phe Ser Arg Ile Trp Asn Ile Pro Val  
530 535 540

His Lys Phe Leu Leu Arg His Val Tyr His Ser Ser Met Ser Ser Phe  
545 550 555 560

Lys Leu Asn Lys Ser Gln Ala Thr Leu Met Thr Phe Phe Leu Ser Ser  
565 570 575

Val Val His Glu Leu Ala Met Tyr Val Ile Phe Lys Lys Leu Arg Phe  
580 585 590

Tyr Leu Phe Phe Phe Gln Met Leu Gln Met Pro Leu Val Ala Leu Thr  
595 600 605

Asn Thr Lys Phe Met Arg Asn Arg Thr Ile Ile Gly Asn Val Ile Phe  
610 615 620

Trp Leu Gly Ile Cys Met Gly Pro Ser Val Met Cys Thr Leu Tyr Leu  
625 630 635 640

Thr Phe

<210> 33  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Kntstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(60)

<400> 33  
atgtcgaaag ctacatataa ggaacgtgct gcatctcatc ccagctgaag cttcgtacgc 60

<210> 34  
<211> 62  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(62)

<400> 34  
ttagtttttgc tggccgcatac ttctcaaata tgcttcccag gcataggcca ctagtggatc 60  
tg 62

<210> 35  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(60)

<400> 35  
gaatactcag gtatcgtaag atgcaagagt tcgaatctct ccagctgaag cttcgtacgc 60

<210> 36  
<211> 62  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(62)

<400> 36  
tctaccctat gaacatatc cattttgtaa tttcgtgtcg gcataggcca ctagtggatc 60  
tg 62

<210> 37  
<211> 60  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(60)

<400> 37

atgacagagc agaaagccct agtaaagcgt attacaaatg ccagctgaag cttcgtagc 60

<210> 38

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(62)

<400> 38

ctacataaga acacctttgg tggagggaac atcgttggta gcataggcca ctagtggatc 60

tg

62

<210> 39

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(60)

<400> 39

atgagtgaag cagaattgag aaaaagacag gcccaattca ccagctgaag cttcgtagc 60

<210> 40

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind



<222> (1)..(62)

<400> 40

ttattgagtt gcttcttggg aagtttggga gggggtttcg gcataggcca ctagtgatc 60

tg

62

<210> 41

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(60)

<400> 41

atgagttctg tcgcagaaaa tataatacaa catgccactc ccagctgaag cttcgtacgc 60

<210> 42

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(62)

<400> 42

ttattcgaag acttctccag taattgggtc tctctttttg gcataggcca ctagtgatc 60

tg

62

<210> 43

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(33)

<400> 43

ctgcggccgc aacatgacca ccaatacggt ccc

33

<210> 44  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(27)

<400> 44  
ttctcgagtc tttagttatg cttgctc

27

<210> 45  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(33)

<400> 45  
ctgcggccgc aagatggacc tggttctcag tgc

33

<210> 46  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(29)

<400> 46  
ttctcgagct acttattctt tgtaaactc

29

<210> 47  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(32)

&lt;400&gt; 47

ctgcggccgc aagatggagc ccgccgtgtc gc

32

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(28)

&lt;400&gt; 48

aactcgagtc agtgccttgc cgccttgc

28

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 1833

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Saccharomyces cerevisiae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1833)

&lt;400&gt; 49

atg	acg	gag	act	aag	gat	ttg	ttg	caa	gac	gaa	gag	ttt	ctt	aag	atc	48
Met	Thr	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Leu	Gln	Asp	Glu	Glu	Phe	Leu	Lys	Ile	
1				5				10						15		

cgc	aga	ctc	aat	tcc	gca	gaa	gcc	aac	aaa	cgg	cat	tcg	gtc	acg	tac	96
Arg	Arg	Leu	Asn	Ser	Ala	Glu	Ala	Asn	Lys	Arg	His	Ser	Val	Thr	Tyr	
		20						25					30			

gat	aac	gtg	atc	ctg	cca	cag	gag	tcc	atg	gag	gtt	tcg	cca	cgg	tcg	144
Asp	Asn	Val	Ile	Leu	Pro	Gln	Glu	Ser	Met	Glu	Val	Ser	Pro	Arg	Ser	
		35					40					45				

tct	acc	acg	tcg	ctg	gtg	gag	cca	gtg	gag	tcg	act	gaa	gga	gtg	gag	192
Ser	Thr	Thr	Ser	Leu	Val	Glu	Pro	Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Gly	Val	Glu	
	50					55				60						

tcg	act	gag	gcg	gaa	cgt	gtg	gca	ggg	aag	cag	gag	cag	gag	gag	gag	240
Ser	Thr	Glu	Ala	Glu	Arg	Val	Ala	Gly	Lys	Gln	Glu	Gln	Glu	Glu	Glu	
65					70				75						80	

tac	cct	gtg	gac	gcc	cac	atg	caa	aag	tac	ctt	tca	cac	ctg	aag	agc	288
Tyr	Pro	Val	Asp	Ala	His	Met	Gln	Lys	Tyr	Leu	Ser	His	Leu	Lys	Ser	
				85					90						95	

aag tct cgg tcg agg ttc cac cga aag gat gct agc aag tat gtg tcg	336
Lys Ser Arg Ser Arg Phe His Arg Lys Asp Ala Ser Lys Tyr Val Ser	
100 105 110	
ttt ttt ggg gac gtg agt ttt gat cct cgc ccc acg ctc ctg gac agc	384
Phe Phe Gly Asp Val Ser Phe Asp Pro Arg Pro Thr Leu Leu Asp Ser	
115 120 125	
gcc atc aac gtg ccc ttc cag acg act ttc aaa ggt ccg gtg ctg gag	432
Ala Ile Asn Val Pro Phe Gln Thr Thr Phe Lys Gly Pro Val Leu Glu	
130 135 140	
aaa cag ctc aaa aat tta cag ttg aca aag acc aag acc aag gcc acg	480
Lys Gln Leu Lys Asn Leu Gln Leu Thr Lys Thr Lys Thr Lys Ala Thr	
145 150 155 160	
gtg aag act acg gtg aag act acg gag aaa acg gac aag gca gat gcc	528
Val Lys Thr Thr Val Lys Thr Thr Glu Lys Thr Asp Lys Ala Asp Ala	
165 170 175	
ccc cca gga gaa aaa ctg gag tcg aac ttt tca ggg atc tac gtg ttc	576
Pro Pro Gly Glu Lys Leu Glu Ser Asn Phe Ser Gly Ile Tyr Val Phe	
180 185 190	
gca tgg atg ttc ttg ggc tgg ata gcc atc agg tgc tgc aca gat tac	624
Ala Trp Met Phe Leu Gly Trp Ile Ala Ile Arg Cys Cys Thr Asp Tyr	
195 200 205	
tat gcg tcg tac ggc agt gca tgg aat aag ctg gaa atc gtg cag tac	672
Tyr Ala Ser Tyr Gly Ser Ala Trp Asn Lys Leu Glu Ile Val Gln Tyr	
210 215 220	
atg aca acg gac ttg ttc acg atc gca atg ttg gac ttg gca atg ttc	720
Met Thr Thr Asp Leu Phe Thr Ile Ala Met Leu Asp Leu Ala Met Phe	
225 230 235 240	
ctg tgc act ttc ttc gtg gtt ttc gtg cac tgg ctg gtg aaa aag cgg	768
Leu Cys Thr Phe Phe Val Val Phe Val His Trp Leu Val Lys Lys Arg	
245 250 255	
atc atc aac tgg aag tgg act ggg ttc gtt gca gtg agc atc ttc gag	816
Ile Ile Asn Trp Lys Trp Thr Gly Phe Val Ala Val Ser Ile Phe Glu	
260 265 270	
ttg gct ttc atc ccc gtg acg ttc ccc att tac gtc tac tac ttt gat	864
Leu Ala Phe Ile Pro Val Thr Phe Pro Ile Tyr Val Tyr Tyr Phe Asp	
275 280 285	
ttc aac tgg gtc acg aga atc ttc ctg ttc ctg cac tcc gtg gtg ttt	912
Phe Asn Trp Val Thr Arg Ile Phe Leu Phe Leu His Ser Val Val Phe	
290 295 300	
gtt atg aag agc cac tcg ttt gcc ttt tac aac ggg tat ctt tgg gac	960
Val Met Lys Ser His Ser Phe Ala Phe Tyr Asn Gly Tyr Leu Trp Asp	
305 310 315 320	

ata aag cag gaa ctc gag tac tct tcc aaa cag ttg caa aaa tac aag	1008
Ile Lys Gln Glu Leu Glu Tyr Ser Ser Lys Gln Leu Gln Lys Tyr Lys	
325 330 335	
gaa tct ttg tcc cca gag acc cgc gag att ctg caa aaa agt tgc gac	1056
Glu Ser Leu Ser Pro Glu Thr Arg Glu Ile Leu Gln Lys Ser Cys Asp	
340 345 350	
ttt tgc ctt ttc gaa ttg aac tac cag acc aag gat aac gac ttc ccc	1104
Phe Cys Leu Phe Glu Leu Asn Tyr Gln Thr Lys Asp Asn Asp Phe Pro	
355 360 365	
aac aac atc agt tgc agc aat ttc ttc atg ttc tgt ttg ttc ccc gtc	1152
Asn Asn Ile Ser Cys Ser Asn Phe Phe Met Phe Cys Leu Phe Pro Val	
370 375 380	
ctc gtg tac cag atc aac tac cca aga acg tcg cgc atc aga tgg agg	1200
Leu Val Tyr Gln Ile Asn Tyr Pro Arg Thr Ser Arg Ile Arg Trp Arg	
385 390 395 400	
tat gtg ttg gag aag gtg tgc gcc atc att ggc acc atc ttc ctc atg	1248
Tyr Val Leu Glu Lys Val Cys Ala Ile Ile Gly Thr Ile Phe Leu Met	
405 410 415	
atg gtc acg gca cag ttc ttc atg cac ccg gtg gcc atg cgc tgt atc	1296
Met Val Thr Ala Gln Phe Phe Met His Pro Val Ala Met Arg Cys Ile	
420 425 430	
cag ttc cac aac acg ccc acc ttc ggc ggc tgg atc ccc gcc acg caa	1344
Gln Phe His Asn Thr Pro Thr Phe Gly Gly Trp Ile Pro Ala Thr Gln	
435 440 445	
gag tgg ttc cac ctg ctc ttc gac atg att ccg ggc ttc act gtt ctg	1392
Glu Trp Phe His Leu Leu Phe Asp Met Ile Pro Gly Phe Thr Val Leu	
450 455 460	
tac atg ctc acg ttt tac atg ata tgg gac gct tta ttg aat tgc gtg	1440
Tyr Met Leu Thr Phe Tyr Met Ile Trp Asp Ala Leu Leu Asn Cys Val	
465 470 475 480	
gcg gag ttg acc agg ttt gcg gac aga tat ttc tac ggc gac tgg tgg	1488
Ala Glu Leu Thr Arg Phe Ala Asp Arg Tyr Phe Tyr Gly Asp Trp Trp	
485 490 495	
aat tgc gtt tcg ttt gaa gag ttt agc aga atc tgg aac gtc ccc gtt	1536
Asn Cys Val Ser Phe Glu Glu Phe Ser Arg Ile Trp Asn Val Pro Val	
500 505 510	
cac aaa ttt tta cta aga cac gtg tac cac agc tcc atg ggc gca ttg	1584
His Lys Phe Leu Leu Arg His Val Tyr His Ser Ser Met Gly Ala Leu	
515 520 525	
cat ttg agc aag agc caa gct aca tta ttt act ttt ttc ttg agt gcc	1632
His Leu Ser Lys Ser Gln Ala Thr Leu Phe Thr Phe Phe Leu Ser Ala	
530 535 540	
gtg ttc cac gaa atg gcc atg ttc gcc att ttc aga agg gtt aga gga	1680

Val Phe His Glu Met Ala Met Phe Ala Ile Phe Arg Arg Val Arg Gly  
 545 550 555 560

tat ctg ttc atg ttc caa ctg tcg cag ttt gtg tgg act gct ttg agc 1728  
 Tyr Leu Phe Met Phe Gln Leu Ser Gln Phe Val Trp Thr Ala Leu Ser  
 565 570 575

aac acc aag ttt cta cgg gca aga ccg cag ttg tcc aac gtt gtc ttt 1776  
 Asn Thr Lys Phe Leu Arg Ala Arg Pro Gln Leu Ser Asn Val Val Phe  
 580 585 590

tcg ttt ggt gtc tgt tca ggg ccc agt atc att atg acg ttg tac ctg 1824  
 Ser Phe Gly Val Cys Ser Gly Pro Ser Ile Ile Met Thr Leu Tyr Leu  
 595 600 605

acc tta tga 1833  
 Thr Leu  
 610

<210> 50  
 <211> 610  
 <212> PRT  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 50  
 Met Thr Glu Thr Lys Asp Leu Leu Gln Asp Glu Glu Phe Leu Lys Ile  
 1 5 10 15

Arg Arg Leu Asn Ser Ala Glu Ala Asn Lys Arg His Ser Val Thr Tyr  
 20 25 30

Asp Asn Val Ile Leu Pro Gln Glu Ser Met Glu Val Ser Pro Arg Ser  
 35 40 45

Ser Thr Thr Ser Leu Val Glu Pro Val Glu Ser Thr Glu Gly Val Glu  
 50 55 60

Ser Thr Glu Ala Glu Arg Val Ala Gly Lys Gln Glu Gln Glu Glu Glu  
 65 70 75 80

Tyr Pro Val Asp Ala His Met Gln Lys Tyr Leu Ser His Leu Lys Ser  
 85 90 95

Lys Ser Arg Ser Arg Phe His Arg Lys Asp Ala Ser Lys Tyr Val Ser  
 100 105 110

Phe Phe Gly Asp Val Ser Phe Asp Pro Arg Pro Thr Leu Leu Asp Ser  
 115 120 125

Ala Ile Asn Val Pro Phe Gln Thr Thr Phe Lys Gly Pro Val Leu Glu  
 130 135 140

Lys Gln Leu Lys Asn Leu Gln Leu Thr Lys Thr Lys Thr Lys Ala Thr  
 145 150 155 160

Val Lys Thr Thr Val Lys Thr Thr Glu Lys Thr Asp Lys Ala Asp Ala

	165		170		175
Pro	Pro Gly Glu Lys Leu Glu Ser Asn Phe Ser Gly Ile Tyr Val Phe				
	180		185		190
Ala	Trp Met Phe Leu Gly Trp Ile Ala Ile Arg Cys Cys Thr Asp Tyr				
	195		200		205
Tyr	Ala Ser Tyr Gly Ser Ala Trp Asn Lys Leu Glu Ile Val Gln Tyr				
	210		215		220
Met	Thr Thr Asp Leu Phe Thr Ile Ala Met Leu Asp Leu Ala Met Phe				
225		230		235	240
Leu	Cys Thr Phe Phe Val Val Phe Val His Trp Leu Val Lys Lys Arg				
	245		250		255
Ile	Ile Asn Trp Lys Trp Thr Gly Phe Val Ala Val Ser Ile Phe Glu				
	260		265		270
Leu	Ala Phe Ile Pro Val Thr Phe Pro Ile Tyr Val Tyr Tyr Phe Asp				
	275		280		285
Phe	Asn Trp Val Thr Arg Ile Phe Leu Phe Leu His Ser Val Val Phe				
	290		295		300
Val	Met Lys Ser His Ser Phe Ala Phe Tyr Asn Gly Tyr Leu Trp Asp				
305		310		315	320
Ile	Lys Gln Glu Leu Glu Tyr Ser Ser Lys Gln Leu Gln Lys Tyr Lys				
	325		330		335
Glu	Ser Leu Ser Pro Glu Thr Arg Glu Ile Leu Gln Lys Ser Cys Asp				
	340		345		350
Phe	Cys Leu Phe Glu Leu Asn Tyr Gln Thr Lys Asp Asn Asp Phe Pro				
	355		360		365
Asn	Asn Ile Ser Cys Ser Asn Phe Phe Met Phe Cys Leu Phe Pro Val				
	370		375		380
Leu	Val Tyr Gln Ile Asn Tyr Pro Arg Thr Ser Arg Ile Arg Trp Arg				
385		390		395	400
Tyr	Val Leu Glu Lys Val Cys Ala Ile Ile Gly Thr Ile Phe Leu Met				
	405		410		415
Met	Val Thr Ala Gln Phe Phe Met His Pro Val Ala Met Arg Cys Ile				
	420		425		430
Gln	Phe His Asn Thr Pro Thr Phe Gly Gly Trp Ile Pro Ala Thr Gln				
	435		440		445
Glu	Trp Phe His Leu Leu Phe Asp Met Ile Pro Gly Phe Thr Val Leu				
	450		455		460
Tyr	Met Leu Thr Phe Tyr Met Ile Trp Asp Ala Leu Leu Asn Cys Val				

465		470		475		480									
Ala	Glu	Leu	Thr	Arg	Phe	Ala	Asp	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Asp	Trp	Trp
				485					490					495	
Asn	Cys	Val	Ser	Phe	Glu	Glu	Phe	Ser	Arg	Ile	Trp	Asn	Val	Pro	Val
			500						505				510		
His	Lys	Phe	Leu	Leu	Arg	His	Val	Tyr	His	Ser	Ser	Met	Gly	Ala	Leu
		515							520				525		
His	Leu	Ser	Lys	Ser	Gln	Ala	Thr	Leu	Phe	Thr	Phe	Phe	Leu	Ser	Ala
		530				535					540				
Val	Phe	His	Glu	Met	Ala	Met	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Arg	Val	Arg	Gly
545					550					555					560
Tyr	Leu	Phe	Met	Phe	Gln	Leu	Ser	Gln	Phe	Val	Trp	Thr	Ala	Leu	Ser
				565					570					575	
Asn	Thr	Lys	Phe	Leu	Arg	Ala	Arg	Pro	Gln	Leu	Ser	Asn	Val	Val	Phe
			580						585				590		
Ser	Phe	Gly	Val	Cys	Ser	Gly	Pro	Ser	Ile	Ile	Met	Thr	Leu	Tyr	Leu
		595							600				605		
Thr	Leu														
		610													

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(33)

&lt;400&gt; 51

ctgcggccgc atcatgtctg ctgttaacgt tgc

33

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(30)



<400> 52  
ttctcgagtt aaccaatcaa ctcaccaaac

30

<210> 53  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer  
|  
<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(35)

<400> 53  
ctgcggccgc aggatgtctg ctaccaagtc aatcg

35

<210> 54  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer  
  
<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(34)

<400> 54  
atctcgagct tagatctttt gttctggatt tctc

34

<210> 55  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer  
  
<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(32)

<400> 55  
ctgcggccgc accatgaagt tttcccaact cc

32

<210> 56  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(33)

<400> 56  
ttctcgagtt agaacttttt gttttgcaac aag

33

<210> 57  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(35)

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<400> 57  
ctgcggccgc aatatggatt tggctttaga agtcg

35

<210> 58  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(31)

<400> 58  
aactcgagtc agttgttctt cttggtatatt g

31

<210> 59  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(34)

<400> 59

ctgcggccgc actatggcaa aggataatag tgag

34

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(32)

&lt;400&gt; 60

ttctcgagct agaaaacata aggaataaag ac

32

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter if Application No

PCT/EP 03/00592

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/52 C12N15/81 C12N9/90 C12N9/02 C12P33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 480 805 A (WOLF FRED R ET AL) 2 January 1996 (1996-01-02)  Column 7, lines 5-9 column 3, line 62 -column 4, line 37 --- -/--	1-5, 16, 17, 19, 21, 22, 28, 42, 44-48, 50-54, 56-58

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June 2003

Date of mailing of the international search report

11/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stolz, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte lal Application No

PCT/EP 03/00592

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SILVE S. ET AL.: "Emopamil binding Protein, a Mammalian Protein that Binds a Series of Structurally Diverse Neuroprotective Agents, Exhibits delta8-delta7 Sterol Isomerase Activity in Yeast" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 37, 13 September 1996 (1996-09-13), pages 22434-22440, XP002245941 the whole document	42,47,57
X	HUSSELSTEIN T. ET AL. : "delat7-Sterol-C5-desaturase: molecular characterization and functional expression of wild-type and mutant alleles" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 39, 1999, pages 891-906, XP002245942 the whole document	42,47, 48,57
X	LEES N D ET AL: "Cloning of the late genes in the ergosterol Biosynthetic pathway of Saccharomyces cerevisiae" LIPIDS, CHAMPAIGN, IL, US, vol. 30, no. 3, 1 March 1995 (1995-03-01), pages 221-226, XP002094332 ISSN: 0024-4201 figure 2	42,47, 48,57
X	NISHI S.: "cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1490, 2000, pages 106-108, XP002245943 cited in the application the whole document	42,47, 48,57
X	WO 98 45457 A (MONSANTO CO) 15 October 1998 (1998-10-15) claims 6,16	42,47,48
P,X	WO 02 061072 A (KARUNANANDAA BALASULOJINI ;MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US); POST-BEIT) 8 August 2002 (2002-08-08) page 72-73; claim 6	42-48, 53-55

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely:

Invention 1

Claims 1-3 (in part), 4-7, 16-41 (in part)

Methods of producing 7-dehydrocholesterol or its intermediate and secondary products, characterized in that the delta8-delta7 isomerase activity is increased

Invention 2

Claims 1-3 (in part), 8-11, 16-41 (in part)

Methods of producing 7-dehydrocholesterol or its intermediate and secondary products, characterized in that the delta5 desaturase activity is increased

Invention 3

Claims 1-3 (in part), 12-15, 16-41 (in part)

Methods of producing 7-dehydrocholesterol or its intermediate and secondary products, characterized in that the delta24 reductase activity is increased

Inventions 4-6

Claims 42-57, each in part

Nucleic acid constructs and organisms transformed thereby containing one of the three abovementioned enzymes alone or in combination with other enzymes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/00592

**Box I. Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II. Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**See continuation sheet**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/EP 03/00592

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5480805	A	02-01-1996	NONE	
WO 9845457	A	15-10-1998	AU 724046 B2	07-09-2000
			AU 5709998 A	30-10-1998
			BR 9714439 A	21-03-2000
			CN 1247569 A	15-03-2000
			EP 0958370 A1	24-11-1999
			WO 9845457 A1	15-10-1998
			US 2002148006 A1	10-10-2002
WO 02061072	A	08-08-2002	WO 02061072 A2	08-08-2002



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen

PCT/EP 03/00592

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/52 C12N15/81 C12N9/90 C12N9/02 C12P33/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 480 805 A (WOLF FRED R ET AL) 2. Januar 1996 (1996-01-02)  Spalte 7, Zeilen 5-9 Spalte 3, Zeile 62 -Spalte 4, Zeile 37 --- -/-	1-5, 16, 17, 19, 21, 22, 28, 42, 44-48, 50-54, 56-58

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Juni 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/07/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stolz, B

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen

PCT/EP 03/00592

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SILVE S. ET AL.: "Emopamil binding Protein, a Mammalian Protein that Binds a Series of Structurally Diverse Neuroprotective Agents, Exhibits delta8-delta7 Sterol Isomerase Activity in Yeast" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 271, Nr. 37, 13. September 1996 (1996-09-13), Seiten 22434-22440, XP002245941 das ganze Dokument	42,47,57
X	HUSSELSTEIN T. ET AL. : "delta7-Sterol-C5-desaturase: molecular characterization and functional expression of wild-type and mutant alleles" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 39, 1999, Seiten 891-906, XP002245942 das ganze Dokument	42,47, 48,57
X	LEES N'D ET AL: "Cloning of the late genes in the ergosterol Biosynthetic pathway of Saccharomyces cerevisiae" LIPIDS, CHAMPAIGN, IL, US, Bd. 30, Nr. 3, 1. März 1995 (1995-03-01), Seiten 221-226, XP002094332 ISSN: 0024-4201 Abbildung 2	42,47, 48,57
X	NISHI S.: "cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1490, 2000, Seiten 106-108, XP002245943 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	42,47, 48,57
X	WO 98 45457 A (MONSANTO CO) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Ansprüche 6,16	42,47,48
P,X	WO 02 061072 A (KARUNANANDAA BALASULOJINI ;MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US); POST-BEIT) 8. August 2002 (2002-08-08) Seite 72-73; Anspruch 6	42-48, 53-55

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

## Erfindung 1

Ansprüche 1-3 (teils), 4-7, 16-41 (teils)

Methoden zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol oder seiner Zwischen- und Folgeprodukte charakterisiert durch Erhöhung der Delta8-Delta7 Isomerase Aktivität

## Erfindung 2

Ansprüche 1-3 (teils), 8-11, 16-41 (teils)

Methoden zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol oder seiner Zwischen- und Folgeprodukte charakterisiert durch Erhöhung der Delta5 Desaturase Aktivität

## Erfindung 3

Ansprüche 1-3 (teils), 12-15, 16-41 (teils)

Methoden zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol oder seiner Zwischen- und Folgeprodukte charakterisiert durch Erhöhung der Delta24 Reduktase Aktivität

## Erfindungen 4-6

Ansprüche 42-57 jeweils teilweise

Nukleinsäurekonstrukte und damit transformierte Organismen enthaltend eines der drei obengenannten Enzyme allein oder in Kombination mit weiteren Enzymen.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/00592

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
  
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefördert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 03/00592

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5480805	A	02-01-1996	KEINE
WO 9845457	A	15-10-1998	AU 724046 B2 07-09-2000
		AU 5709998 A	30-10-1998
		BR 9714439 A	21-03-2000
		CN 1247569 A	15-03-2000
		EP 0958370 A1	24-11-1999
		WO 9845457 A1	15-10-1998
		US 2002148006 A1	10-10-2002
WO 02061072	A	08-08-2002	WO 02061072 A2 08-08-2002

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**